

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені Тараса Шевченка

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені Ігоря Сікорського»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАЗУРЕНКО ВІКТОРІЯ РАДІОНІВНА

УДК 618.19-002:616.98

ДИСЕРТАЦІЯ

**КОМПЛЕКСНА БІОТЕХНОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА КОНТАГІОЗНОГО
МАСТИТУ КОРІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на

відповідне джерело.

МАЗУРЕНКО В. Р.

Науковий керівник: Колибо Денис Володимирович, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Мазуренко В. Р. **Комплексна біотехнологічна діагностика контагіозного маститу корів** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. «Біотехнологія». – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, м. Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена удосконалення методів діагностики контагіозних маститів великої рогатої худоби.

Мастит (запалення молочної залози) великої рогатої худоби є мультифакторним захворюванням, що досі залишається головною причиною економічних збитків у розвинутих країнах. Знання про механізми патогенезу та розвитку маститу постійно розширюються, а виникнення нових штамів бактерій з мультирезистентністю до антибіотиків сприяє пошуку нових ефективних терапевтичних засобів для лікування. Отже, контроль збудників є обов'язковою умовою для профілактики та лікування маститу.

Біотехнологічний процес харчової промисловості прагне забезпечити ринок якісними та цінними харчовими продуктами, що можуть бути отримані тільки з використанням молока високої якості. Своєю чергою на якість молока впливають такі показники як кількість соматичних клітин, наявність бактерій, інгібіторів (залишки ветеринарних препаратів-антибіотиків, гормони тощо), екзогенна контамінація бактеріями. Заходи, що забезпечують належну якість молока: підтримка здоров'я молочної залози шляхом постійної профілактики хвороби вимені, визначення і виключення мікробіологічних та хімічних джерел забруднення.

Зараз у багатьох країнах світу велику увагу приділяють вивченню хвороби молочної залози, етіології та профілактики захворювання.

У зв'язку із зазначеним пошукам нових заходів для підвищення рівня молочної продуктивності та покращення якості молока є актуальним та має науково-практичне значення.

Третій розділ дисертаційного дослідження присвячений ідентифікації бактеріальних ізолятів, виділених із молока українських корів. Авторкою проведено аналіз антибіотико чутливості та антибіотико резистентності бактерій.

Проведена оцінка розповсюдження бактеріальних ізолятів на фермах України дозволяє стверджувати, що поширення патогенних збудників зростає та потребує розв'язання актуальної проблеми.

Унаслідок проведених досліджень встановлено, що при субклінічному інфікуванні молочної залози 100% усіх виділених ізолятів є контагіозними збудниками маститу. Проте, унаслідок вивчення на мастит (клінічні та субклінічні форми) зразків, які надходили з різних ферм України, встановлено, що позитивними за *Staphylococcus aureus* є 15% і за *Streptococcus agalactiae* – 26% зразків, 59% зразків містять неконтагіозні (умовно-патогенні) збудники маститу.

Крім того, проаналізувавши антибіотикочутливість та антибіотикорезистентність, отримали дані, що більшість ізолятів бактерій, які викликають мастит, є чутливими до амоксициліну + клавуланової кислоти та гентаміцину – 93,5% усіх досліджуваних зразків. Контагіозні збудники маститу чутливі до амоксициліну, амоксициліну + клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, флоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, рифампіцину та триметоприму; стійкі до тилозину та стрептоміцину. Також показано, що *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp*, *Aspergillus spp* мають 100% дію у порівнянні з *Escherichia coli* 75%, *Staphylococcus aureus* 70% демонструють бактерицидну дію засобу після доїння корів. Отримані дані свідчать, що для оптимального результату перед

початком застосування необхідно перевіряти чутливість дезінфекційних засобів.

З досліджуваних на наявність генетичного матеріалу 20 зразків молока *Mycoplasma bovis* було виявлено у 10 зразках, що є підставою говорити про розповсюдження цього захворювання на території країни.

Отримані результати дослідження показали, що 2 з 20 зразків молока мають низький рівень активності ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ), а кількість соматичних клітин становила 250 000 в 1 мл. паралельно проводили бактеріологічні дослідження зразків та отримали негативні результати, що можуть свідчити про відсутність інфекції молочної залози та фізіологічне збільшення кількості СК в секреті. При підвищеній активності ферменту ЛДГ та кількості СК, яка не перевищує 250 000 в 1 мл, у кожному окремому випадку виділяли монокультуру. При кількості СК від 250 000 до 500 000 в 1 мл (4 з 20 зразків молока) ідентифікувались, бактерії *Streptococcus agalactiae*, так і *Staphylococcus aureus*, що вказувало на змішану інфекцію.

Також методом протокової цитометрії встановлено: некротичні клітини соматичних клітин молока у корови без мастита складають 24% порівнянні з 67% у корів з маститом. Кількість апоптотичних СК у корови без маститу складає 33% у порівнянні з 12% у корів з маститом. Унаслідок цього можна зробити висновок, що апоптоз тісно пов'язаний з функціональністю нейтрофілів та макрофагів та відіграє ключову роль у захисті від вторгнення патогенів та фізіології запальної реакції.

Новизна роботи полягає в наступному. Визначено інфекційну етіологію маститу корів та встановлено, що основними збудники запалення молочної залози є мікроорганізми, які представлені: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* та *Mycoplasma spp.* Встановлено, що збудники контагіозного маститу є чутливими до амоксициліну, амоксициліну +

клавуланової кислоти, гентаміцину та менш стійки до тилозину та стрептоміцину.

Виявлено генетичний матеріал ДНК *Mycoplasma bovis* на 10 фермах України з Миколаївської, Полтавської, Харківської, Київської області, що дає підставу зробити висновок про поширеність збудника на території України. Визначено, що при низьких значеннях соматичних клітин (180 000 клітин в 1 мл. молока) можливо спостерігати субклінічне інфікування молочної залози корів.

Отже, внаслідок комплексного поєднання біологічних методів дослідження обґрунтований науковий підхід моніторингу статусу здоров'я вимені на наявність субклінічного запалення на фермі, що допоможе якісно провести мікробіологічний аналіз молока за умови поділення зразків на групи, що дозволить відстежувати контагіозні збудники, як в стаді корів, так і в групі тварин.

З метою виявлення контагіозних збудників та ранньої діагностики субклінічних маститів запропоновано та розроблено науковий підхід до діагностики контагіозних маститів на фермах України, який полягає у комплексному застосуванні застосованих методів.

Ключові слова: Субклінічний мастит, контагіозні збудники, лактатдегідрогеназа, соматичні клітини, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*.

ANNOTATION

Mazurenko V.R — Comprehensive biotechnological diagnosis of contagious mastitis in cows. Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 — biotechnolodgy. National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute» of Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

Mastitis (inflammation of the mammary gland) in dairy cattle is a multifactorial disease, which still is a main cause of economic problems in the developed countries. The knowledge about the mechanisms of pathogenesis and development of mastitis is gradually expanding, and emergence of new multiresistant to antibiotics bacterial strains encourages the search for new effective therapeutic options for treatment. So, the control of the pathogens is a mandatory condition for the prevention and treatment of mastitis.

Biotechnological process of the food industry craves to provide the market with quality and valuable food that can only be obtained by using high-quality milk.

As for the milk quality, it is influenced by the following indicators: the number of somatic cells, the absence of pathogenic bacteria and inhibitors (residues of veterinary drugs, antibiotics, hormones, etc.), exogenous contamination.

There are measures to ensure proper milk quality, such as: maintaining breast health by constantly preventing udder disease, identifying and eliminating microbiological and chemical sources of contamination. Many countries around the world are now paying close attention to the study of udder disease, its etiology and prevention.

In this regard, the search for new measures to increase milk productivity and improve milk quality is relevant and has scientific and practical significance. The thesis is devoted to the identification of bacterial isolates taken from Ukrainian milk cows.

The author analyzed the antibiotic sensitivity and antibiotic resistance of bacteria. For the first time in Ukraine, the use of lactate dehydrogenase for the initial detection of early subclinical infection has been proposed. The assessment of the spreading of bacterial isolates on farms in Ukraine suggests that the prevalence of pathogens is growing and this issue needs to be addressed.

The study has shown that in case of subclinical infection of mammary gland 100 % of selected isolates are contagious mastitis pathogens. However, due to analyzed mastitis samples (clinical and subclinical forms) from different farms of Ukraine, it was found that 15 % of samples were positive for *Staphylococcus aureus* and 26 % of samples – for *Streptococcus agalactiae*, 59 % of samples contained non-contagious pathogens of mastitis.

In addition, it is shown that most isolates of bacteria that cause mastitis are sensitive to amoxicillin + clavulanic acid and gentamicin – 93.5% of all samples. Contagious mastitis pathogens susceptible to Amoxicillin, Amoxicillin + Clavulanic acid, Gentamicin, Ampicillin, Lincomycin, Cloxacillin, Rifampicin, Bacitracin, Rifampicin, and Trimethoprim; resistant to Tylosin and Streptomycin. It is also illustrated that *Streptococcus agalactiae*, *Candida* spp, *Aspergillus* spp have a 100 % effect compared to *Escherichia coli* 75 %, *Staphylococcus aureus* 70 % bactericidal effect after milking cows. The obtained data shows that for optimal results it is necessary to check the sensitivity of disinfectants before use.

Having tested 20 samples of milk for the presence of genetic material *Mycoplasma bovis* was found in 10 of them which is a reason to talk about the spread of this disease in the country.

The research findings illustrated that 2 out of 20 milk samples have low levels of the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) and somatic cells of the level was 250,000 in 1 ml. and negative bacteriological test results, which may indicate the absence infection of mammary gland and physiological increase in the amount of SC in secretion. With increased activity of the LDH enzyme and the level

of SC, which does not exceed 250,000 in 1 ml, in every single case either bacteria *Streptococcus agalactiae* or *Staphylococcus aureus* was isolated, indicating monoinfection. At the level of SC from 250,000 to 500,000 in 1 ml (4 out of 20 milk samples) both bacteria *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* were isolated, which indicated a mixed infection.

Using the flow cytometry, the following indicators were detected: Precipitate of SC necrotic cells in cows without mastitis are 24 % compared with 67 % in cows with mastitis. The number of apoptotic SC in cows without mastitis is 33 % compared with 12 % in cows with mastitis. As a result, we conclude that apoptosis is closely related to the function of neutrophils and macrophages and plays a key role in protecting against pathogens and the physiology of the inflammatory response.

The novelty of the work is as follows. The infectious etiology of mastitis in cows was determined, and it was found that the main pathogens of inflammation of the breast are microorganisms, which are represented by: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Mycoplasma* spp. Pathogens of contagious mastitis have been found to be sensitive to amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, gentamicin, and less resistant to tylosin and streptomycin.

The genetic material of *Mycoplasma bovis* DNA was found on 10 farms of Ukraine from Mykolayiv, Poltava, Kharkiv, Kyiv regions, which gives grounds to draw a conclusion about the prevalence of the pathogen on the territory of Ukraine. it is possible to observe subclinical infection of the mammary gland of cows.

Thus, as a result of a complex combination of biological research methods, a scientific approach to monitoring udder health status for the presence of subclinical inflammation on the farm is justified, which will help to qualitatively perform microbiological analysis of milk by dividing samples into groups. And in the group of animals. In order to identify contagious pathogens and provide an early diagnosis

of subclinical mastitis, a scientific approach to diagnosis on farms in Ukraine has been proposed and developed.

Key words: Subclinical mastitis, contagious pathogens, lactate dehydrogenase, somatic cells, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*.

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

(які входять до переліку ДАК/ МОН України)

1. Mazurenko VR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017;3(3):26–29. Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку
2. Mazurenko VR., Manchulyak OV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. Biotechnologia Acta.2017;10(4):53-54. Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку

Статті в іноземних виданнях:

3. Mazurenko VR, Dreval DV, Sobko IO. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. Bacterial empire. Scicell. 2020;3(4):77-80. (Республіка Словачія) Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Мазуренко ВР (Хайруліна), Нечипоренко ОО. Перспективи використання штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* ІКМ В-5113 для профілактики маститів корів. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології; 2014 лютий 23-24; Донецьк, Україна.2014, С. 286. (усна доповідь)

2. Мазуренко ВР (Хайруліна). Оцінка вмісту лізоциму в секреті вимені корів хворих на субклінічний мастит. Імунологія та алергологія додаток №1 Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в ХХІ столітті; 2014 квітня 10-11; Київ, Україна. 2014. С 166. (стендова доповідь)
3. Mazurenko VR., Mazurenko OV, Chvostenko OG. Bactericidal effect of post-milking teat dip by «Povidon-Protect». II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine. 2016. P.119; (стендова доповідь)
4. Mazurenko VR, Sobko IO. Evaluate effectiveness of different antibiotics and prevalence of contagious mastitis pathogens on dairy farms in Ukraine. II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine. 2016. P.114; (усна доповідь).
5. Mazurenko VR, Sobko IO, Molozhava OS, Kolybo DV. Milk analysis by flow cytometry to identify subclinical mastitis. Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна 2020. с.11-14. (публікація тез).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Епідеміологія та імунобіологія маститу корів.....	24
1.1.1. Причини та класифікація маститу корів.....	24
1.1.2. Захисні механізми молочної залози та маркери запалення.....	25
1.1.1.1 Імунологічні компоненти захисту молочної залози корів.....	25
1.1.1.2 Біологічне значення ферменту лактатдегідрогенази у молоці.....	31
1.2 Контагіозні збудники маститу.....	32
1.2.1 Деякі аспекти <i>Mycoplasma spp</i>	32
1.2.2 Характеристика бактерій <i>Staphylococcus aureus</i> та їхня роль в патогенезі маститу ВРХ	34
1.2.3 Біологічні властивості бактерій <i>Streptococcus agalactiae</i> та їхній зв'язок з запаленням молочної залози корів.....	38
1.3 Енвіронментальні збудники маститу корів.....	40
1.3.1. Деякі аспекти патогенезу <i>Streptococcus uberis</i> та коагулазо негативні штами <i>Staphylococcus spp</i>.....	41
1.3.2. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів та формування біоплівки.....	43
1.4 Моніторинг якості молока та здоров'я вимені корів в Україні.....	46
1.5 Лабораторна діагностика маститу великої рогатої худоби.....	49
1.5.1 Гігієна доїння та гігієнічні засоби для дезінфекції та догляду за ділками корів.....	50

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1	Відбір зразків та схеми дослідження55
2.1.2	Для визначення клітинного осаду молока методом протокової цитометрії58
2.2	Використані в роботі матеріали та реактиви.....	59
2.2.1	Обладнання.....	59
2.3	Молекулярно-біологічні методи дослідження.....	59
2.3.1	Підбір праймерів для проведення полімеразно-ланцюгової реакції.....	60
2.3.2	Виділення ДНК з біологічного матеріалу за допомогою набору «Рибосорб».....	60
2.4	Проведення та інтерпретація бактеріологічного дослідження...	66
2.4.1	Інтерпретація результатів бактеріологічних тестів систем Арі biomerieux™ ..	70
2.4.2	Ідентифікація <i>Streptococcus</i> spp. за допомогою комерційної тест-системи MIKRO-LA TEST®.....	71
2.4.3	Проведення аналізу на антибіотикочутливість бактерій диско-дифузійним методом	73
2.4.4	Визначення бактерицидної дії засобу «Повідонпротект» (якісний аналіз)...	74

2.5	Визначення ферменту лактатдегідрогенази в молоці корів	75
2.6	Визначення кількості соматичних клітин в молоці проводили за допомогою набору Porta SCC (США).....	76
2.6.1	Інтерпретація результатів досліджень.....	77
2.7	Проведення протокової цитометрії.....	77
2.7.1	Підготовка проб молока до протокової цитометрії.....	78
2.7.2	Проведення протокової цитометрії та інтерпретації отриманих результатів.....	78
2.8	Програмне забезпечення.....	79
РОЗДІЛ 3. МІКРОБНИЙ ПЕЙЗАЖ СЕКРЕТУ ВИМ'Я КОРІВ ПРИ МАСТИТІ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ		
3.1	Бактеріологічний моніторинг різних форм маститу корів.....	80
3.2	Дослідження бактерицидної дії гігієнічного засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0,3%, повідон йоду 0,2 %, виробник ТОВ «Санвет».....	84
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ		86
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МІКОПЛАЗМОВОГО МАСТИТУ У КОРІВ НА ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ ТА КОНТРОЛЬ ПОШИРЕННЯ <i>Mycoplasma bovis</i>		
4.1	Дослідження <i>Mycoplasma spp</i>	88
4.2	Дослідження <i>Mycoplasma bovis</i>	89

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

РОЗДІЛ 5 ВИЗНАЧЕННЯ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ТА ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЯК ДОПОМІЖНИХ БІОМАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ СУБКЛІНІЧНОГО МАСТИТУ В МОЛОЧНІЙ ЗАЛОЗІ КОРІВ

5.1 Визначення соматичних клітин та лактатдегідрогенази, як основних біомаркерів запалення субклінічного маститу в молочній залозі корів.....96

5.2 Аналіз осаду клітин молока за допомогою протокової цитометрії для ідентифікації субклінічної інфекції.....98

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....105

ВИСНОВКИ.....115

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....117

ДОДАТКИ140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВІВ	внутрішніх інфекцій вимені
ВРХ	велика рогата худоба
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ІФА	імуноферментний аналіз
КАМР	Крісті-Аткінсона-Мунка-Петерсона
КНШС	коагулазо-негативний штам стафілакоків
КСК	кількість соматичних клітин
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ЛПС	ліпополісахарид
НАД	нікотинамідаденіндинуклеотид
ПЛР	полімеразноланцюгова реакція
ПМА	полісахаридна міжклітинна адгезія
ПБ-білки	білок, пов'язані з біоплівкою
РНК	рибонуклеїнова кислота
РНК	рибонуклеїнова кислота
СК	соматичні клітини

ВСТУП

Актуальність теми. Запалення молочної залози великої рогатої худоби – широко розповсюджене в молочному скотарстві захворювання, яке спричиняє комплекс взаємопов’язаних проблем, що стосуються не лише здоров’я тварин, а й безпеки харчових продуктів. Мастити не тільки знижують продуктивність корів, але і призводять до погіршення хімічного складу і якості молока.[1].

Не зважаючи на велику кількість наукових досліджень, розробок та рекомендацій, що стосуються патології молочної залози у тварин, мастит залишається найбільш поширеною в молочному скотарстві хворобою, що потребує біотехнологічних розробок та вирішення [2].

Мастит – це мультифакторне захворювання, що спричиняє ряд проблем, такі як проблеми тваринництва – зниження надоїв молока, погіршення його якості. Існують також економічні – зниження ефективності молочного бізнесу [2, 3], та соціальні проблеми – вживання молока і молочних продуктів від корів, хворих на мастит створює велику небезпеку для здоров’я людей, особливо дітей [4].

Як свідчать експериментальні дані багатьох дослідників, у молоці, отриманому від хворих на мастит корів, збільшується кількість соматичних клітин (переважно лейкоцитів), білків, хлоридів, підвищується лужність, щільність, бактеріальне забруднення, зменшується вміст жиру, лактози, знижується його бактерицидна активність. Усе це спричиняє зміну властивостей і смакових якостей молока, яке втрачає свою поживну цінність і технологічні властивості, необхідні для виробництва [141].

Американська національна рада з питань маститу розробила спеціальні програми всесвітньої боротьби з маститом корів, спрямовані на своєчасне виявлення хворих тварин, встановлення причини хвороби та проведення лікувальних і профілактичних заходів. Наразі вони впроваджені в дію в

розвинутих країнах (Америка, Велика Британія, країни Західної Європи тощо) [5, 6]. На території нашої держави програми контролю контагіозних збудників, які є першопричиною субклінічних форм маститів, відсутні. Натомість фахівці застосовують санітарну оцінку молока за державними стандартами України [7].

Запалення молочної залози у корів – досить поширене захворювання, особливо у місцях із високим рівнем механізації та автоматизації виробництва, інтенсивною експлуатацією тварин. Воно реєструвалося завжди, відсоток захворюваності становив близько 50-60%. [142]. Сьогодні на окремих молочних фермах на нього може перехворіти до 35% тварин. Найбільший економічний збиток завдає субклінічний мастит, що характеризується відсутністю візуальних ознак хвороби, широким ареалом поширення. [143]. Обстеження поголів'я в господарствах України показало, що субклінічний мастит спостерігається у 40-50% корів. Величезний економічний збиток захворювання завдає молочним стадам у країнах Західної Європи. Захворюваність клінічними маститами в молочних стадах Німеччини становить 20-60%. У Франції захворюваність корів маститами становить 30%, у Великобританії втрати від маститів складають 35% [144].

За нормами американських та європейських стандартів, допустима кількість соматичних клітин у молоці екстракласу складає не більше ніж 100-170 тис. клітин / 1 мл. [145,146]. За українським стандартом ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови – не більше ніж 400 тис. / мл. [147].

Відмінність прихованої форми маститу від клінічної полягає в тому, що він не має виражених зовнішніх ознак, окрім підвищеного числа соматичних клітин у молоці. За нормами як зазначалось вище, визначеними технічною документацією, допустима кількість соматичних клітин складає 100 000 тис. / мл. [146]. Водночас її підвищення понад 200 тис. / мл. свідчить про початок

субклінічного маститу. Корів, які дають таке молоко, необхідно щодня обстежувати, оскільки запальний процес порушує і пригнічує секреторну діяльність їхніх молочних залоз, що істотно позначається на продуктивності, призводить до її зниження [147,148].

Більшість попередніх досліджень в Україні були зосереджені на вивченні поширеності та кількох факторів ризику розвитку маститу на рівні окремих корів, водночас не було докладено зусиль для оцінки поширеності, управління та гігієнічної практики на рівні стада / ферми. Відсутні також дослідження контагіозного маститу з акцентом на субклінічний тип. Крім того, відсутні дослідження, присвячені наявній в молоці лактатдегідрогеназі, як маркеру субклінічного запалення та сигналу до відбору для мікробіологічного дослідження.

З огляду на це, важливо оцінити вплив збудників клінічного і субклінічного маститу на українських фермах та рекомендувати профілактичні заходи для зменшення випадків захворювання. Враховуючи величезну економічну вагу цього питання, вивчення субклінічного маститу на рівні стада має вирішальне значення для розробки можливих стратегій його профілактики та контролю, тому що мастити не тільки знижують продуктивність корів, але і призводять до погіршення хімічного складу і якості молока.

З огляду на вище зазначене, важливим напрямом проведення наукових досліджень є розробка біотехнологічних методів діагностики та лікування хвороби.

Матеріали дисертаційної роботи можуть бути використані під час розробки практичних рекомендацій із питань діагностики і профілактики субклінічного маститу в корів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження Мазуренко В.Р, виконане на кафедрі мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Т. Шевченка в межах бюджетної наукової теми №16 БФ036-01 “Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів” (науковий керівник теми – д.б.н., проф. директор ННЦ «Інститут біології та медицини» Остапченко Л.І) та пов’язана з науковими темами, які розробляються в ТОВ Центр Ветеринарної Діагностики в м. Київ

Метою дисертаційного дослідження було вдосконалення біотехнологічних засобів діагностики контагіозного маститу в корів шляхом застосування комплексних біологічних методів дослідження.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити етіологію маститу корів на території України;
2. Проаналізувати чутливість та антибактеріальну резистентність його збудників до антимікробних препаратів;
3. Виявити ДНК *Mycoplasma bovis*, поширеного на молочно-товарних фермах України;
4. Визначити граничну кількість соматичних клітин у молоці, яка сигналізує про наявність у корів маститу;
5. Впровадити визначення ферменту лактатдегідрогенази як допоміжного аналізу для визначення контагіозних субклінічних маститів.

Об’єкт дослідження — секрет вимені корів та ізоляти мікроорганізмів;

Предмет дослідження — закономірності існування умовно-патогенних мікроорганізмів та взаємозв'язок розвитку запалення молочної залози корів

Методи дослідження — бактеріологічні (культуральний висів), молекулярні дослідження (полімеразно-ланцюгова реакція), імунологічні (протокова цитометрія), біохімічні дослідження (ферментативні реакції), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше удосконалено науковий підхід моніторингу статусу здоров'я вимені корів на наявність

субклінічного запалення. Встановлено, що внаслідок контролю контагіозних збудників на фермі покращиться якість молока корів.

Було проведено визначення ферменту лактатдегідрогенази, як допоміжного біомаркера запалення молочної залози та обґрунтовано комплексне поєднання біологічних методів дослідження для визначення інфекційних збудників у секреті вимені корів.

Отже, внаслідок комплексного поєднання біологічних методів дослідження обґрунтований науковий підхід моніторингу статусу здоров'я вимені на наявність субклінічного запалення на фермі, що допоможе якісно провести мікробіологічний аналіз молока за умови поділення зразків на групи, що дозволить відстежувати контагіозні збудники, як в стаді корів, так і в групі тварин.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати забезпечують фахівців інформацією, необхідною для вдосконалення методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання. Результати досліджень використано для розробки комплексного підходу до діагностики маститу в корів, впроваджено в протокол роботи ТОВ Центру ветеринарної діагностики (м. Київ), в якому проводиться діагностика вірусних та бактеріальних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці з усієї України

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою авторки.

Розробка плану експерименту та його реалізація, отримання експериментальних даних, їхнє узагальнення, інтерпретація здійснені авторкою особисто на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом проф. Колибо Д. В.

Автором проаналізовано поширення бактеріальних ізолятів виділених з молока корів у 2015-2016 рр. на території України досліджено разом із директором Центру ветеринарної діагностики Собко І. О.

Лабораторну діагностику маститу ВРХ методом ПЛР та бактеріологічними методами проведено в Центрі ветеринарної діагностики самостійно під керівництвом Собко І. О.

Розробка схем алгоритмів дослідження контагіозних маститів проведений автором особисто на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом наукового керівника Колибо Д. В.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дослідження були неодноразово оприлюднені на ряді всеукраїнських і міжнародних наукових з'їздів, конференцій таких як: Фундаментальні та прикладні дослідження в біології 2014р. лютий 23-24, Імунологія та алергологія. Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в ХХІ столітті, 2014 квітня 10-11, II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century, 2016 April 14-15; Kyiv, Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових праць, 3 із яких – статті (1 у міжнародному виданні), 5 – тези доповідей на всеукраїнських і міжнародних наукових конференціях.

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

(які входять до переліку ВАК/ МОН України)

1. Mazurenko VR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017;3(3):26–29. Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку

2. Mazurenko VR., Manchulyak OV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. *Biotechnologia Acta*.2017;10(4):53-54. Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку

Статті в іноземних виданнях:

3. Mazurenko VR, Dreval DV, Sobko IO. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. *Bacterial empire. Scicell*. 2020;3(4):77-80. (Республіка Словачія) Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Мазуренко ВР (Хайрулліна), Нечипоренко ОО. Перспективи використання штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliguefaciens* ІКМ В-5113 для профілактики маститів корів. *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології*; 2014 лютий 23-24; Донецьк, Україна.2014, С. 286. (усна доповідь)

7. Мазуренко ВР (Хайрулліна). Оцінка вмісту лізоциму в секреті вимені корів хворих на субклінічний мастит. *Імунологія та алергологія додаток №1 Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в ХХІ столітті*;2014 квітня 10-11; Київ, Україна.2014.С 166. (стендова доповідь)

8. Mazurenko VR., Mazurenko OV, Chvostenko OG. Bactericidal effect of post-milking teat dip by «Povidon-Protect». *II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century*; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine.2016. P.119; (стендова доповідь)

9. Mazurenko VR, Sobko IO. Evaluate effectiveness of different antibiotics and prevalence of contagious mastitis pathogens on dairy farms in Ukraine. *II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century*”;2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine.2016. P.114; (усна доповідь).

10. Mazurenko VR, Sobko IO, Molozhava OS, Kolybo DV. Milk analysis by flow cytometry to identify subclinical mastitis. Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна 2020. с. 11-14. (публікація тез).

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 5 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, 174 списку використаних джерел (найменувань, з них кирилицею – 25, латиницею – 148), 2 додатка на 139 стор.. Загальний обсяг дисертації становить 141 сторінки друкованого тексту, основну частину роботи викладено на 116 сторінках, проілюстровано 10 рисунками, 14 таблицями.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Епідеміологія та імунобіологія маститу корів

1.1.1 Причини та класифікація маститу корів

Мастит – запалення молочної залози, яке виникає внаслідок зниження імунно-захисних реакцій в організмі та проникнення бактерії через дійки в паренхіму залози [8]. Причини появи маститів у корів можуть бути різними: порушення менеджменту господарства (переохолодження, невідповідність мікроклімату санітарним нормам, сирість та холод, антисанітарні умови у хліві), порушення правил доїння, недостатність вітамінів та мікроелементів, наявність хронічних хвороб та інших запальних інфекційних процесів, ускладнення після отелу, наявність травм, тріщин на дійках, укуси комах [4, 9].

Запалення вимені корів відрізняються за ступенем тяжкості, класифікуються відповідно до ознак і симптомів. Існує багато різних класифікацій, що використовуються для опису маститів, але найчастіше їх поділяють на клінічний та субклінічний [10].

Клінічний мастит характеризується видимими ознаками запалення вимені, змінами в молоці. Ці симптоми можуть також супроводжуватися посиленням температури тіла [11].

Субклінічний мастит – найбільш поширена форма маститу. На кожні 15-40 його випадків припадає усього лише один випадок клінічного маститу [149]. Видимі ознаки запалення при субклінічному маститі відсутні. Тому діагностувати його можливо лише за допомогою лабораторних методів та експрес-діагностики [12]. Усі форми запалення вимені корів знижують надої молока [13].

За способом інфікування та механізмами передачі мастити поділяють на контагіозний та енвіроментальний. Збудники контагіозного маститу

передаються від корови до корови через доїльний апарат. При енвіроментальний маститі інфікування відбувається, головним чином, через підстилку та корми. [150].

1.1.2 Захисні механізми молочної залози та маркери запалення

Молоко постійно виробляється в молочній залозі альвеолами та продукується епітеліоцитами, які пронизані кровоносними судинами [14]. Молочна залоза має різні клітинні, анатомічні та гуморальні захисні механізми, які допомагають запобігти вторгненню в залозу патогенних мікроорганізмів. Збудники зазвичай потрапляють у чверті через дійковий канал до, та під час або після періодів лактації [15].

У період сухостою та між доїнням дійковий канал ущільнюється кератиною пробкою, яка утворюється з багат шарового плоского епітеліального покриву всередині протоки. Це утворює ефективний фізичний та мікробний бар'єр, який запобігає вторгненню мікроорганізмів. Однак, пошкодження пробки може тимчасово або назавжди збільшити проникність дійкового каналу, збільшуючи у такий спосіб імовірність інфікування молочних залоз [16]. Кількість СК молока, особливо лейкоцитів, значно збільшується, коли є бактеріальна інфекція.

1.1.2.1 Імунологічні компоненти захисту молочної залози корів

Порушення імунного гомеостазу займає основну роль в етіології маститів корів. Зниження імунних механізмів місцевого та гуморального імунітету пригнічує здатність протидії інфекціям молочною залозою. Таким чином

мікроорганізми проникають через канал діжок та долають механізми захисту, зумовлюючи надалі розвиток маститу корів [17].

Існує два компоненти захисту молочної залози – клітинний та гуморальний. Обидва вони відіграють значну роль у послабленні та усуненні інфекцій. Важливе значення у протибактеріальному імунітеті організму тварин відіграють фагоцити [151].

Білі кров'яні тіลця (моноцити, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, лімфоцити) потрапляють у молоко через кров і є частиною системи захисту. Їхня основна функція – боротьба з хворобами та допомога у відновленні пошкоджених тканин. Будь-який мастит призводить до збільшення кількості цих клітин у молоці [19].

Щоразу, коли резидентні макрофаги в молочній залозі виявляють наявність бактерій, вони сигналізують іншим лейкоцитам та імунним клітинам про інфекційний процес [21].

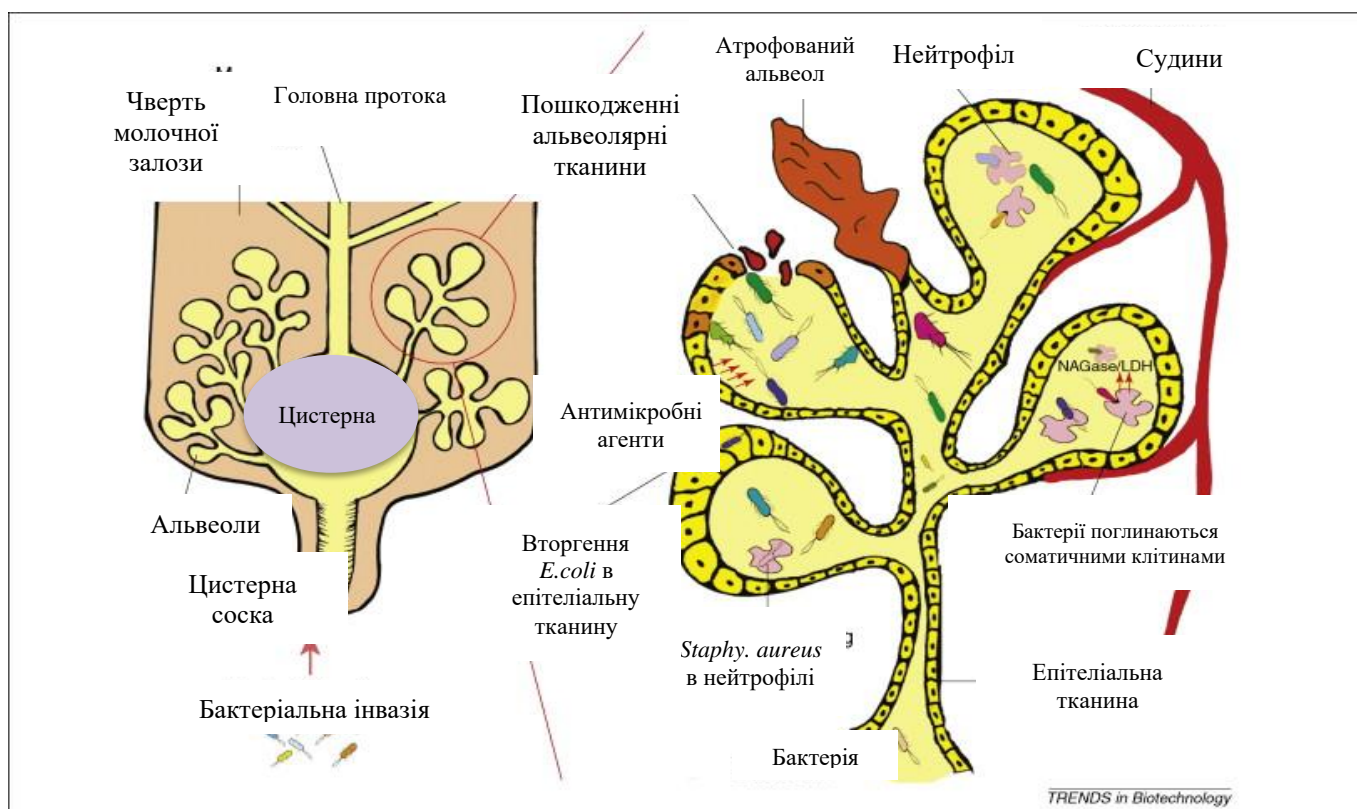


Рис. 1.1. Збудники маститу з навколишнього середовища та контагіозні мікроорганізми, які потрапляють у вим'я через дійкову цистерну [155].

Фагоцитарні клітини, а саме нейтрофіли та макрофаги, після виявлення бактерій, як правило, блокують та фагоцитують їх. Як тільки бактерії інтерналізують, фагоцитарні клітини руйнують їх, виділяючи деякі ферменти, здатні перетравлювати бактеріальні компоненти. Перша лінія захисту під час запалення, що домінує є нейтрофіл, який потрапляє в молочну залозу з крові. [22,23].

Збудники маститу потрапляють у вим'я через дійкову цистерну. Фагоцитарні клітини (нейтрофіли та макрофаги) після виявлення бактерій зазвичай блокують та фагоцитують їх. Щойно бактерії інтерналізують, фагоцитарні клітини руйнують їх, виділяючи деякі ферменти, здатні перетравлювати бактеріальні компоненти. Першою лінією захисту під час запалення виступає нейтрофіл, який потрапляє в молочну залозу з крові. [22, 23].

Нейтрофіли – це основні клітини крові, залучені до елімінування присутніх у молочній залозі бактерій. Зважаючи на це, вони переважають в маститному молоці (становлять до 75% усіх білих клітин крові) [152]. Вони експресують широкий спектр рецепторів розпізнавання за зразком, здатні до ендоцитозу інфекційних агентів з наступною їхньою деградацією у фаголізосомі. Остання формується злиттям фагосоми з цитоплазматичними гранулами нейтрофілів, котрі містять бактерицидні речовини [164]. Рекрутинг нейтрофілів у зони інфекції забезпечується хемокінами (ІЛ-8) та цитокінами, котрі активують експресію молекул адгезії, продукованими активованими макрофагами [24]. Отже, підвищення вмісту нейтрофілів у молоці з низьким вмістом соматичних клітин може модулювати початкові етапи імунного захисту вимені.

Цитокіни, які виробляються насамперед клітинами імунної системи, представлені глікопротеїдами, які регулюють специфічну та неспецифічну

імунну відповідь, представлену фактором як $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 та інших речовин. Хемоаттрактанти, як-от IL-8 та компонентами комплементу C5a , C3b , C3bi індукують хемотаксис нейтрофілів з кровоносних судин у молочну залозу [25].

Однією з форм антибактеріальної дії нейтрофілів є пікноз – клітинна загибель, що супроводжується екструзією (викидом) внутрішньоклітинного вмісту, представленого ДНК і гістонами, антибактеріальними білками та пептидами, ферментами та реактивними сполуками кисню). Окисне пошкодження ефективне проти грам-негативних бактерій, але такі бактерії, як золотистий стафілокок, який виробляє каталазу, можуть йому протистояти. Нейтрофіл, який виконав свої функції, швидко гине. Апоптичні нейтрофіли швидко утилізуються макрофагами шляхом ефероцитозу [26].

Спостерігається збільшення макрофагів, які переважають інші клітини крові у корів без маститу. Під час фаз лактації та «сухостою» у корів відсоток макрофагів у молоці найвищий – до 68%. У післяпологовий період спостерігається його зменшення до 21% [27-29].

Достатньо вивчено роль медіаторів запалення у молочній залозі – інтерлейкіни, лейкотрієни, простагландини, Fe комплекси та інші сполуки. Натуральні кілери (НК), що містять Fc -рецептор і виконують активну цитостатичну дію відіграють важливу роль у патогенезі маститу [151,152].

Встановлено, що специфічна гуморальна імунна відповідь здійснюється В-клітинами. При запальному процесі активовані Т-хелпери виступають ефекторною ланкою в системі головного комплексу гістосумісності II. Вони також активізують утворення IL-2 , який стимулює проліферацію В-клітин [153].

Відомо, предомінантні ізотипи імуноглобулінів в молоці корів – це IgG1 , які вибірково переносяться в молоко з сироватки крові. Цей ізотип опсонізує бактерії для їх фагоцитозу макрофагами[30]. Оскільки нейтрофіли збираються

у вогнищі запалення, концентрація IgG2 зростає, водночас ізотип може опсонізувати бактерії для їх фагоцитозу нейтрофілами. IgM також може брати участь в опсонізації. IgA аглютинують бактерії, перешкоджають бактеріальній адгезії до епітелію і нейтралізують бактеріальні токсини [31].

Фізіологічний процес очищення секретом молочної залози також грає роль у природному захисті. Жирні кислоти, присутні в кератиновому шарі, підсилюють бактеріостатичний ефект [32].

Неспецифічні антибактеріальні фактори – лактоферин, комплемент, лізоцим, лактопероксидаза також відіграють важливу роль в захисті вимені. Лактоферин підсилює бактеріостатичний ефект, зв'язуючи вільне залізо, яке стає недоступним бактеріям для утилізації [33].

З огляду на низьку концентрацію лактоферина в молочній залозі під час лактації основна його функція припадає на захист від коліформних бактерій упродовж періоду сухостою корів. Володіє вираженою бактерицидною дією та лізисом ліпополісахаридного комплексу. [34]. Концентрація лактоферина збільшується на початку субклінічної запальної реакції та різко зростає (до рівня 5–6 мг/мл) до початку гострої фази клінічного маститу [154].

Лізоцим – білок, який володіє бактерицидною активністю проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, оскільки присутній у низькій концентрації в коров'ячому молоці [35, 36]. З-поміж інших механізмів захисту цей – досить важливий. Лактопероксидаза володіє бактеріостатичним ефектом щодо грамнегативних бактерій та бактерицидним ефектом щодо грампозитивних бактерій. Вона синтезується в епітелії молочної залози [37]. Комплемент, активований альтернативним шляхом, може впливати на грамнегативні бактерії [31].

Концентрація соматичних клітин в молоці – незначна. Абсолютна їхня більшість – це клітини секреторної тканини вимені (епітеліальні клітини) [18]. Зустрічаються також лейкоцити (білі кров'яні клітини). З огляду на це,

кількість соматичних клітин у молоці є одним з основних маркерів, що визначає інфекційний статус. А втім, відомо, що КСК може також підвищуватись унаслідок різних фізіологічних реакцій та у період лактації. КСК у неінфікованій молочній залозі корів у період лактації складає менше ніж 100 000 клітин / 1 мл. [20], однак в деяких джерелах зазначено менше ніж 200 000 клітин / 1 мл. У багатьох країнах вміст соматичних клітин розглядається як критерій гігієнічної якості молока та впливає на його вартість [164].

Соматичні імунні клітини є другою лінією захисту, тоді як перша лінія – це анатомічний і хімічний бар'єри верхівки дійки та каналу в молочній залозі [19].

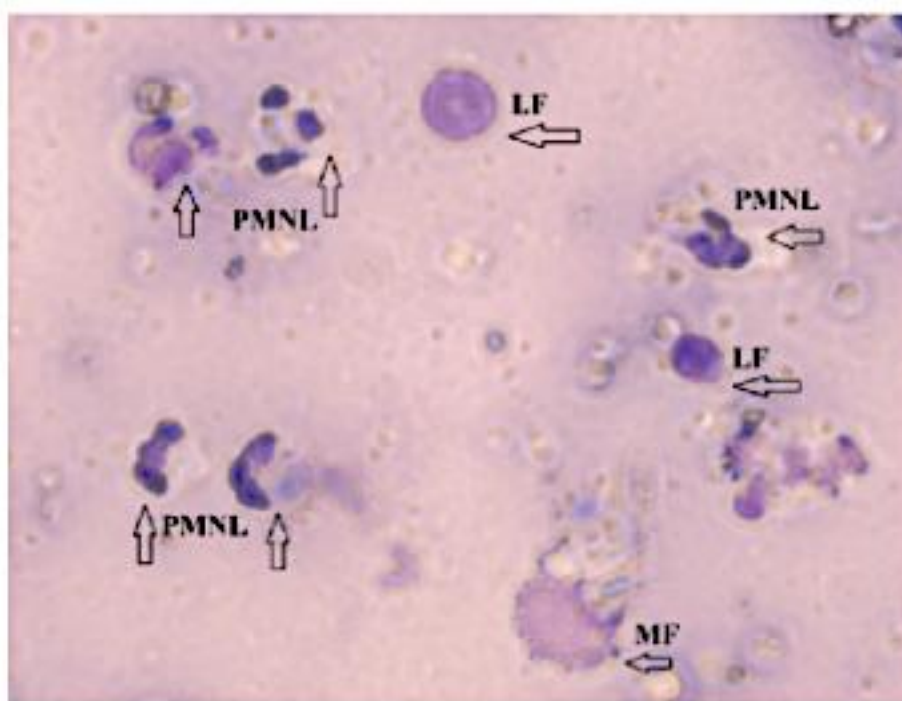


Рис. 1.2. Мікроскопічне дослідження мазка соматичних клітин молока. ПМНЛ: поліморфно-ядерні лейкоцити; НЧ: лімфоцити; МФ: макрофаги; збільшення 1000х. [156].

Наявність епітеліальних клітин у молоці є наслідком десквамації епітелію молочних проток та альвеол молочної залози, нормальним фізіологічним явищем і необхідна для регенерації нормального епітелію. Більшість

присутніх у молоці відшарованих епітеліальних клітин є життєздатними та мають характеристики повністю диференційованих альвеолярних клітин [18].

1.1.2.2 Біологічне значення ферменту лактатдегідрогенази у молоці корів

Дієвим маркером руйнування секреторних тканин у вимені є концентрація ЛДГ у молоці, що визначає інфекційний процес у молочній залозі. ЛДГ – це гліколітичний фермент, який бере участь у процесах гліколізу – перетворенні піровиноградної кислоти на молочну кислоту. Він складається з 4 субодиниць 2 різних типів – Н і М відповідно; тож існує 5 ізоферментів ЛДГ. Концентрація ЛДГ пов'язана з рівнем соматичних клітин у молоці, що своєю чергою залежить від впливу таких умов, як стрес, харчування, стадія лактації тощо.

Присутність ферменту в молоці корів при маститі пов'язана зі збільшенням кількості лейкоцитів та епітеліальних клітин у вимені. Дослідження [38] свідчать, що активність ЛДГ часто підвищується раніше ніж вміст соматичних клітин, що робить її відмінним біомаркером для раннього виявлення інфекцій у вимені.

Сучасним напрямом сучасної імунології та біотехнології є вивчення механізмів імунорегуляції та розробка нових методів діагностики та профілактики. Дослідженнями вчених доведено, що базою виникнення маститу є імунологічна недостатність, яке призводить до зниження функцій імунної системи в клітинних та гуморальних реакціях корів. Актуальним питанням залишається проблема вивчення апоптозу нейтрофілів, що є перспективним напрямом у розробці нових методів діагностики та терапії маститу []. Таким чином, мастити корів є багатофакторним захворюванням, які залежать від прояву захисних сил організму тварини, вірулентних властивостей збудника, що впливають на запальний процес. Вище зазначені дані необхідно враховувати при розробці методів ранньої діагностики маститів корів, оцінки адекватності та ефективності проведеного лікування.

1.2 Контагіозні збудники маститу

Контагіозні збудники маститу, як показано в попередніх дослідженнях, мають здатність до латентної інфекції та є першопричиною субклінічного запалення молочної залози [39]. Існує багато патогенних бактерій, які викликають запалення молочної залози, наприклад, *Corynebacterium bovis*. А втім, основними контагіозними збудниками маститу у корів є *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* та *Mycoplasma bovis* [41]. Названі мікроорганізми потрапляють у молочну залозу через канал діжок і швидко поширюються від корови до корови під час доїння. Вони здатні пристосовуватися до умов життя в організмі хазяїна та мають певні особливості.

Наприклад, стрептококи та мікоплазми чутливі до впливу навколишнього середовища. Бактерії можуть існувати поза організмом господаря упродовж коротших проміжків часу, ніж стафілококи. Імунна відповідь на запалення молочної залози безпосередньо залежить від ознак вірулентності патогенів [42, 43].

1.2.1. Деякі аспекти *Mycoplasma spp.*

Mycoplasma spp. належать до найпростіших прокаріотів, які живуть вільно. За своїми розмірами вони скидаються на віруси. Проте, мають власну систему реплікації ДНК, транскрипцію та синтез білка, здатні розмножуватися в умовах штучного живильного середовища. Розміри геному в представників класу *Mollicutes* можуть сильно варіюватися – від 580 до 2200 тис. пар основ [44].

Мікоплазмоз є поширеною у тваринництві хворобою, яка завдає господарствам чималих економічних збитків через вибракування молока,

необхідність витрати коштів на лікування хворих корів, їхнє вибракування, зниження собівартості молочних продуктів і т. ін. [45, 46].

Основні види мікоплазм, за винятком деяких видів мікоплазм, які можуть розмножуватись в інших ділянках тіла та поширюватися системно, потрапляють у молочну залозу через дійки. За цих умов необхідно враховувати, що мікоплазми також можуть викликати запалення секреторної тканини молочної залози та ускладнювати процес лікування [47].

Мікоплазмоз має різні клінічні прояви, спричиняє не тільки ураження вимені, але й проблеми репродуктивної та опорно-рухової системи, запалення очей і вух тварин [47, 48]. Переносником захворювання може бути будь-яка хвора на мастит корова, яка спочатку мала респіраторну або репродуктивну форму мікоплазмозу, оскільки мікроорганізми потрапляють у молочну залозу через кровоносну систему [49]. Тобто контагіозність та стійкість бактерій у стаді зазвичай залежать від багатьох факторів: кількості заражених тварин та стану загального імунітету, рівня стресу тощо.

Відсутність клітинної стінки у представників класу *Mollicutes* робить їх більш чутливими до навколишнього середовища, через що вони мають знижену здатність до виживання поза тілом тварини [50]. Під час інфекційного процесу вони зазвичай локалізуються в імунокомпетентних клітинах (макрофагах). *Mycoplasma bovis*, потрапляючи в епітеліальні клітини молочної залози, запускають клітинну імунну відповідь організму, що проявляється збільшенням експресії мРНК фактору некрозу пухлин альфа, інтерлейкінів (IL) IL-1 β , IL- 6, IL-8, лактоферину, Toll-like рецептора 2, хемокіну та амілоїду у сироватці крові [48, 51].

Хронічний характер цієї інфекції свідчить про те, що всі компоненти імунної системи можуть брати участь у реакції на *Mycoplasma spp.* Проте, Т-лімфоцити є основним компонентом імунної реакції на мікоплазмозу інфекцію. Прогресування маститу залежить від балансу між компонентами

клітинної імунної відповіді, що може як сприяти підвищенню резистентності організму-господаря, так і викликати імуно-опосередкований патогенез [52]. Тому визначення наявності *Mycoplasma spp.* в молоці є важливою частиною програми боротьби із маститом.

1.5.2 Характеристика бактерій *Staphylococcus aureus* та їхня роль в патогенезі маститу ВРХ

Не зважаючи на впровадження контрольних заходів, на багатьох фермах реєструють *Staphylococcus aureus* – часту причину клінічних та субклінічних маститів [53]. Ці бактерії колонізують шкіру та канал діжок, виділяють токсини та знижують місцеву імунну функцію, що призводить до запалення паренхіми молочної залози [54]. В навколишньому середовищі існують упродовж кількох тижнів.

Передача інфекції відбувається через чашки для обробки вимені, використання багаторазових ганчірок, необроблені антибактеріальними препаратами руки доярок [55]. Бактерії *S. aureus* адгезують до слизової оболонки молочних протоків і виробляють ряд вірулентних факторів [56].

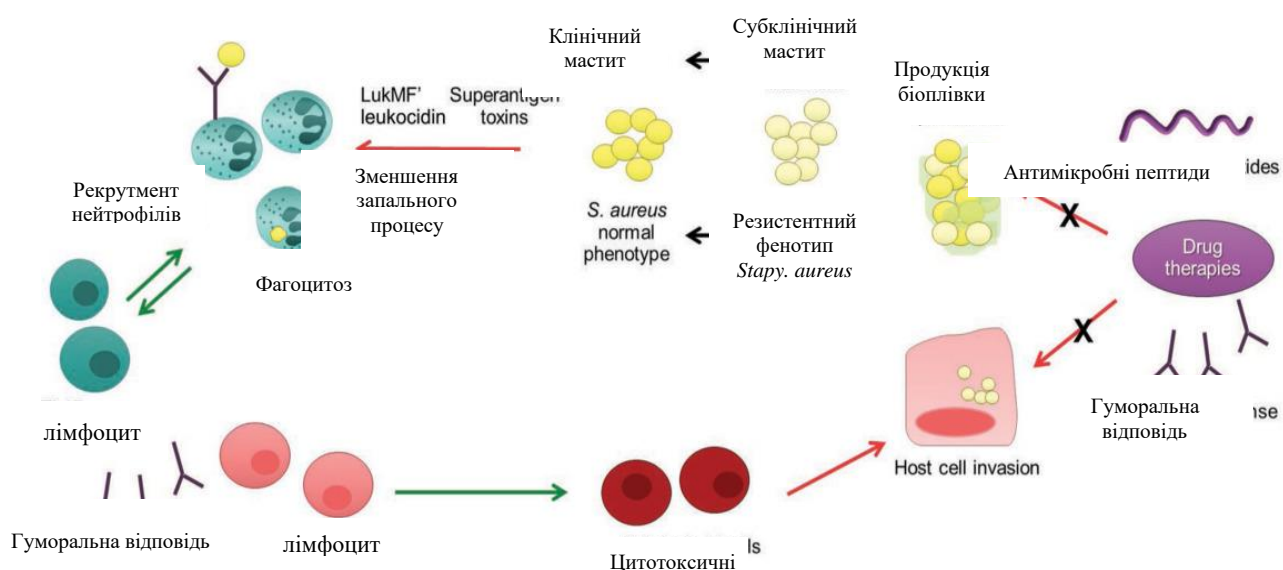


Рис. 1.2. Стратегії стійкості *Staphy. aureus* та ухилення від імунітету молочної залози [157] .

Ферменти, такі як гіалуронідаза, стафілокіназа, протеїнкаіназа, коагулаза, фібринолізин, ДНК-аза, ліцетовітелаза та ін. дозволяють долати місцеву імунну відповідь [57].

Ферменти бактерій *S. aureus* мають широкий спектр дії: каталаза захищає бактерії від O₂-залежних механізмів фагоцитів; β-лактамаза руйнує молекулу β-лактамних антибіотиків; ліпази полегшують адгезію і проникнення в тканини; коагулаза забезпечує конверсію фібриногену в фібрин, перешкоджає контактам із фагоцитами; гіалуронідаза руйнує сполучну тканину; ліпаза (лецитовітелаза) забезпечує гідроліз ліпідів; стафілокіназа (фібринолізин) руйнує фібринові згустки; дезоксирибонуклеаза сприяє руйнуванню ДНК та розріджує гній [57, 58, 59].

Антифагоциторийний фактор («псевдокапсула») дозволяє стафілококам протистояти фагоцитозу та виживати в фагоцитованих клітинах, бактерії здатні до персистенції та розмноження в фагоцитах. Мікрокапсула захищає бактерії від комплемент-опосередкованого поглинання поліморфноядерними фагоцитами, сприяє адгезії мікроорганізмів і їхньому поширенню по тканинах [60].

Білок А взаємодіє з Fc – фрагментом антитіла (Ig G1, Ig G2, Ig G4) [61]. Тейхоєві кислоти регулюють концентрацію катіонів на клітинній мембрані, зв'язують фібронектин, запускають комплементарний каскад по альтернативному шляху, активують систему згортання і калікреїн-кінінової системи, полегшують адгезію до епітеліальних поверхонь [61, 62].

З-поміж токсинів найбільше значення мають:

1) ексфоліат А і В – спричиняють розвиток синдрому «ошпареної шкіри»;

2) токсин синдрому токсичного шоку – відповідає за розвиток синдрому специфічного симптомокомплексу (шляхом стимулювання виділення фактору некрозу пухлин);

3) δ -токсин (лейкоцидин) – має цитотоксичну дію, спрямовану на поліморфноядерні лейкоцити; [63, 64].

Токсини, як-от гемолізін (мембранотоксин) і лейкоцидин, є токсичними для клітин крові тварин. Виділяють 4 антигенні типи гемолізинів, які викликають повний гемоліз середовищ із кров'ю. Золотисті стафілококи здатні одночасно синтезувати кілька подібних продуктів [60].

1) α -гемолізін (α -токсин) найбільш часто виявляють у бактерій, виділених з клінічних зразків. Неактивний щодо еритроцитів людини, але швидко лізує еритроцити барана [61];

2) β -гемолізін помірно діє на еритроцити людини; виявляється у 20% ізолятів. Виявляє виражені властивості холодового гемолізу (максимальна активність при низьких температурах);

3) γ -гемолізін – двокомпонентний гемолізін з помірною активністю щодо еритроцитів людини;

4) δ -гемолізін – агрегат низькомолекулярних сполук, які проявляють детергентні властивості, які обумовлюють цитотоксичність широкого спектра [61, 65].

Компоненти клітинної стінки стимулюють розвиток запальних реакцій: підсилюють синтез АБО-1 макрофагами, активують систему комплементу і є потужними хемоатрактантами для нейтрофілів [58].

Отже, розмноження бактерій відбувається головним чином у збірних протоках і певною мірою в альвеолах. Запальний процес призводить до закупорки протоки та атрофії альвеол. Велика кількість фагоцитарних клітин може призвести до формування абсцесу та фіброзу, що додатково обмежує ефективний кліренс організму корів, а також заважає проникненню

антибіотиків під час лікування. Деякі інфекції вим'я долаються за допомогою імунних механізмів. А втім, більшість з них стають хронічними, або субклінічними, що призводить до значних втрат.

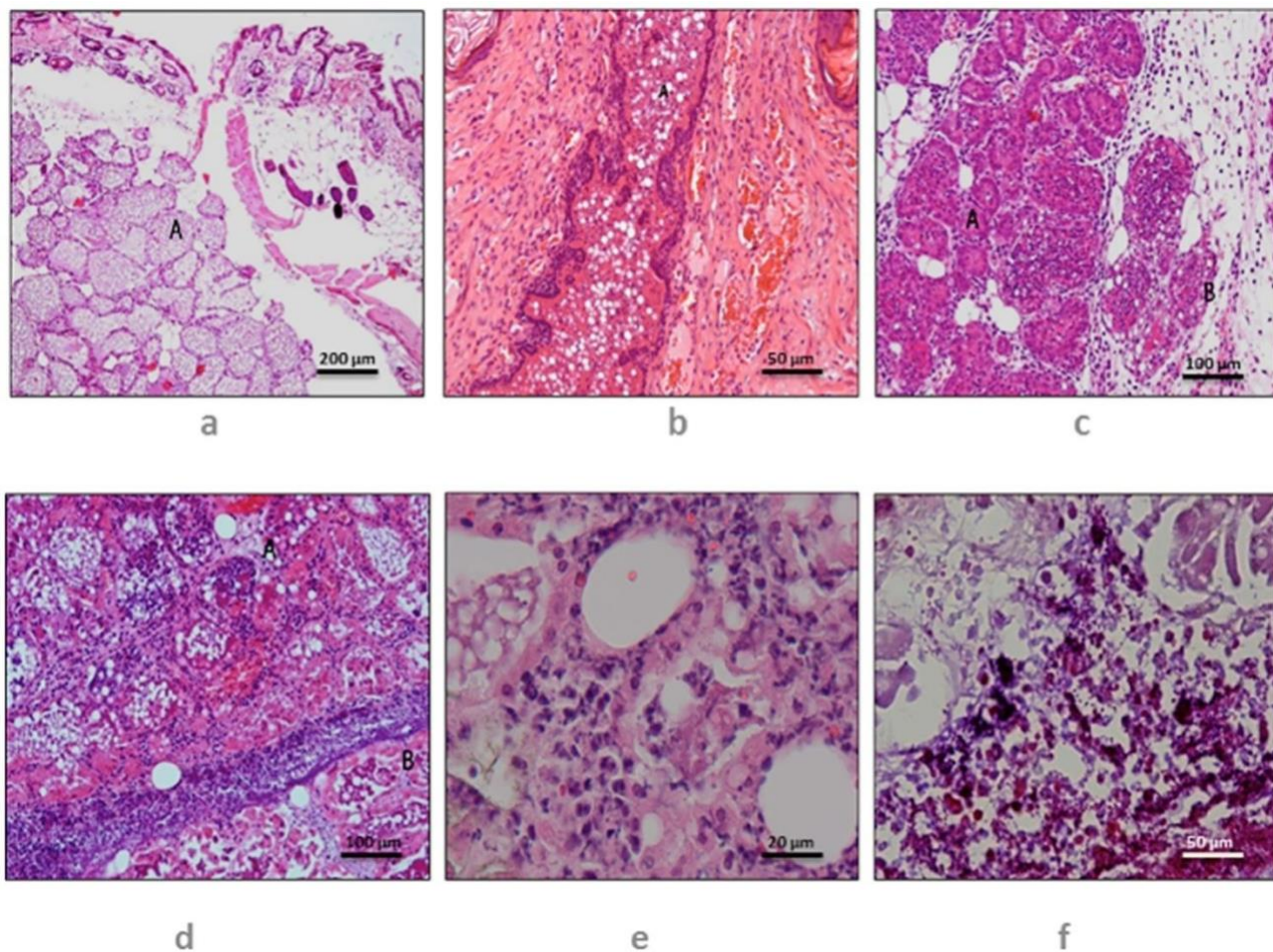


Рис. 1.3 Гістологічне дослідження патологічного матеріалу вимені миші (відтворення моделі поетапного запалення молочної залози на контрольних мишах після введення бактерій *S. aureus* [67].

Проведено гістологічне дослідження відтворення моделі поетапного запалення молочної залози на контрольних мишах [66]. Воно демонструє запальну реакцію в молочній залозі миші унаслідок введення через молочну протоку бактерій *S. aureus*.

Етапи запалення:

I етап характеризується гострою реакцією, багатою нейтрофілами та запальним ексудатом (рис. 1b);

II етап характеризується вираженим гострим інфільтратом, багатим на нейтрофіли (А), та некрозом тканин (В) (рис. 1с);

III етапи характеризується вираженим гострим інфільтратом, багатим на нейтрофіли, (А) та некрозом тканин (В) (рис. 1d);

IV етап запалення характеризується запальним ексудатом, багатим на нейтрофіли (рис. 1 е);

V етап характеризується наявністю грампозитивних бактерій та багатим на нейтрофіли запальним ексудатом (рис. 1f) [67].

1.5.3 Біологічні властивості бактерій *Streptococcus agalactiae* та їхній зв'язок з запаленням молочної залози корів

Останніми роками на території Західної Європи, Великої Британії та Сполучених Штатів Америки спостерігається зменшення ролі *Streptococcus agalactiae* як збудника маститу в корів [68]. Для вітчизняних фермерських господарств він усе ще є проблемою.

St. agalactiae – стрептококи групи В, грамнегативні бактерії коко-видної форми, які є контагіозно-облігатними паразитами молочної залози корів. Здебільшого є причиною субклінічних форм маститів [69].

Новітні дослідження, проведені в Норвегії, виявили, що шлунково-кишковий тракт великої рогатої худоби та середовище дійних корів є резервуарами *St. agalactiae*. Відповідно до них існують 2 цикли передачі цих бактерій: заразний цикл передачі через доїльний апарат та фекально-оральний цикл передачі через пиття води [70].

Люди також є значним резервуаром *St. agalactiae*. Наприклад, ці бактерії, не виявляючи жодних клінічних ознак, можуть бути присутніми в репродуктивних шляхах жінок [71]. Водночас вони спричиняють значну захворюваність та смертність у немовлят і дорослих по всьому світу, головним чином як внутрішньо- та позалікарняна інфекція [71, 72].

Потрапивши в молочну залозу корови, *St. agalactiae* розмножуються та проникають в молочні протоки. Звідти вони надходять в лімфатичний вузол, відтак – у залозу. Запальна реакція, яка виникає внаслідок цього, призводить до закупорки протоків і атрофії секреторних тканин дійок [73].

Streptococcus agalactiae належать до групи піогенних гемолітичних стрептококів. Серологічно вони належать до групи В (за Ленсфілдом). Як зазначалось вище, реакція їхнього забарвлення за Грамом є позитивною. Половина їхніх штамів – β -гемолітичні. Більшість штамів – позитивні за тестом Крісті-Аткінсона-Мунка-Петерсона (КАМП) [74].

Стрептококи володіють такими факторами вірулентності, як капсула, адгезини, токсини, ферменти та ін. Капсула стрептококів серогрупи В має полісахаридну основу, однак її імуногенність вивчена недостатньо. Клітинна стінка стрептококів складається з 3 шарів, основним компонентом яких є пептидоглікан, до складу якого входить полісахарид С та ліпотьохоеві кислоти. Полісахарид С – це гаптен. Ліпотьохоеві кислоти забезпечують прикріплення стрептококів до епітеліальних клітин макроорганізму. Поверхневий білок Т стійкий до дії протеолітичних ферментів [75].

Поверхня стрептококів вкрита фімбріями та М-протеїном. Під час мікроскопії стрептококів групи А за допомогою електронного мікроскопа встановлено, що М-білки виглядають як волоски на поверхні бактеріальної клітиної стінки. М-білки забезпечують здатність стрептококів протистояти опсонізації та фагоцитозу [76].

Токсини стрептококів – еритрогенний екзотоксин, гемолізін, лейкоцидин, некротичний токсин. До факторів патогенності стрептококів відносять також ферменти: гіалуронідазу, плазміногензв'язуючі протеази, стрептокінази, енолазу, дезоксирибонуклеазу [76].

1.3. Енвaйронментальні збудники маститу корів

Мастит, спричинений бактеріями з навколишнього середовища (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*), грампозитивними бацилами, дріжджовими грибками, *Streptococcus spp.*, крім *S. agalactiae*, розповсюджується переважно за межами доїльної зали [77].

Присутні в довкіллі бактерії, особливо *E. coli* та *Streptococcus uberis*, є причиною клінічних маститів у корів у багатьох країнах.

Здатність даної групи бактерій виживати та розмножуватися в навколишньому середовищі призводить до бактеріальної контамінації кінчиків дійок – важливого фактору розвитку маститу [78, 79]. Під час взяття проб для бактеріологічного аналізу з тирси, яка використовувалася для підстилки для ВРХ, часто відділяють такі мікроорганізми як *Klebsiella spp.* та *Escherichia coli*.

Кількість інфікування корів у приміщеннях закритого типу зазвичай вищий, ніж рівень інфікування на пасовищах. Багато умовно-патогенних збудників викликають інфекції в період сухостою (період вагітності корови) та упродовж 2 тижнів після отелення [80].

Збудники з навколишнього середовища (енвaйронментальна група маститу) зазвичай мають коротшу тривалість інфікування, ніж контагіозні. Крім цього, інфікування здебільшого має клінічний характер запалення, особливо якщо його причиною є коліформні бактерії. Останні хоч і виявляють стійкість до умов навколишнього середовища, але передача інфекції відбувається головним чином під час доїння через забруднені руки доярок,

гумові клапани для дійок та багаторазові ганчірки для вимені, підстилку корів і т. ін. [79, 80].

Нещодавно проведені дослідження показують, що ризик розвитку маститу в корів із низьким і високим рівнем соматичних клітин перевищує ризик розвитку маститу в корів із проміжним рівнем соматичних клітин. *E. coli* та більшість грамнегативних бактерій мають у своїй зовнішній клітинній мембрані макромолекули ліпополісахариди (ЛПС), які є основним фактором їхньої патогенності [81].

Отже, бактерії *E. coli* потрапляють в організм корів через канал дійок; швидко розмножуються в цистерні вимені, виділяють ендотоксин або ліпополісахарид (ЛПС) – основний компонент зовнішніх мембран. На поверхні кожної бактерії існує приблизно 10^6 молекул ЛПС. Для організму вони є сигналом присутності в ньому грамнегативних бактерій. ЛПС не є токсичним, поки його молекула перебуває в зовнішній бактеріальній мембрані. Зустрівши ж толл-подібні рецептори (ТПР-4), впізнає та зв'язується з консервативною ділянкою клітинної стінки ліпиду А – токсичної ділянки молекули ЛПС та запускає каскад імунної-запальної реакції. Ендотоксин та інші компоненти клітинної стінки можуть вивільнятися тільки під час ділення або лізису клітин [82].

1.3.3. Деякі аспекти патогенезу *Streptococcus uberis* та коагулазо негативні штами *Staphylococcus spp.*

Streptococcus uberis належить до групи бактерій із навколишнього середовища, які призводять до маститу великої рогатої худоби, та становить значну частку субклінічних і клінічних інфекцій в молочній залозі. Він здатний адгезувати та інвазувати в епітеліальних клітинах молочної залози [79].

Контамінація бактеріями *St. uberis* підстилки для великої рогатої худоби вважається важливим джерелом, що сприяє передачі бактерій від однієї тварини до іншої. У всьому світі зафіксовано почастищення випадків маститу, викликаного *St. uberis*. Приблизно у 14-26% випадків клінічного маститу в Канаді, США, Нідерландах та Великобританії спричинені цим збудником [80].

Бактерії *St. uberis* також є однією з найважливіших причин маститу великої рогатої худоби в Новій Зеландії та Австралії, де осердям молочної промисловості є пасовища. *St. uberis* виділяють з багатьох ділянок тіла корови, включаючи поверхню шкіри, статеві шляхи, шлунково-кишковий тракт та мигдалини [83]. Крім цього, велика кількість цих бактерій присутня на підстилці [80].

Коагулазонегативні стафілококи (КНС) є грампозитивними. Серед збудників умовно-патогенного маститу вони становлять більшість.

Умовно-патогенні мікроорганізми завжди присутні на шкірі дійок і складають нормальну флору шкіри. Їх називають опортуністичними (сапрофітами), оскільки за умови зниженого імунітету вони можуть викликати інфекційний процес [84].

Найбільш поширені КНС: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* та *Staphylococcus hyicus* [85]. Коагулазо-негативні стафілококи призводять лише до помірного збільшення СКМ. Більшість випадків маститу, викликаного КНС, мають субклінічну форму запалення. [86].

Оскільки ознаки та симптоми запалень, спричинених КНС, є відносно помірними, роль цих мікроорганізмів в патогенезі маститу в минулому ставили під сумнів та ігнорували [87, 88].

Corynebacterium bovis – коменсал шкіри дійок корів. Спричинені ним інфекції переважають у фермерських господарствах, у яких ігнорують гігієнічну обробку вимені корів та спеціальну профілактичну терапію в період

їхнього сухостою. Також останні дослідження показують, що колонізація цим мікроорганізмом протоки молочної залози призводить до незначного підвищення КСК без зниження молочної продуктивності та біохімічного складу молока. Отже, *C. bovis* треба відносити до сапрофітної мікрофлори вимені корів [89, 90].

1.3.2 Антибіотикорезистентність мікроорганізмів та формування біоплівок

Станом на сьогодні проблема розвитку антибіотикорезистентності мікроорганізмів має глобальний характер. Стійкість до антимікробних препаратів є природною біологічною реакцією, спрямованою на збереження життєздатності мікробної популяції, що виникає як результат природного відбору. Внаслідок нераціонального і некваліфікованого використання антибіотиків та засобів для дезінфекції число резистентних штамів постійно зростає, а полірезистентні збудники інфекційних захворювань мають тенденцію до поширення в зовнішньому середовищі [91].

Одним із можливих способів подолання стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів є хімічна модифікація їхніх молекул, спрямована на створення нових препаратів, активних щодо антибіотикорезистентних мікроорганізмів [92]. У такий спосіб були отримані напівсинтетичні пеніциліни та цефалоспорини, стійкі до дії β -лактамаз: метицилін, оксацилін, діклоксацилін, цефамандол, цефуроксим, цефсулодін і ряд інших. Однак, через деякий час після початку використання нових препаратів у плазмідах і транспозонах знову відбувається поширення детермінант резистентності до них, що призводить до зниження їхньої ефективності та породжує необхідність синтезу нових антимікробних засобів [93].

Іншим перспективним методом боротьби з поширенням антибіотикорезистентності бактерій є використання комплексів, що

пригнічують певні механізми стійкості їхніх клітин. Одним із таких є клавуланова кислота, яка має слабку антибактеріальну активність та здатна необоротно інгібувати пеніцилінази грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів [94].

Одним із найбільш перспективних способів, що обмежують появу та поширення стійких штамів мікроорганізмів, є використання комбінації антимікробних препаратів [95]. Крім того, їхні раціонально підібрані поєднання можуть впливати на стійкі штами мікроорганізмів за допомогою зниження активності ферментів. Зокрема, при комбінуванні левоміцетину з ампіциліном та окситетрацикліну з пеніциліном вдається впливати на штами *Staphylococcus spp.*, які продукують β -лактамази, що призводить до відновлення чутливості цих мікроорганізмів до β -лактамних антибіотиків [96].

Формування біоплівок – організованих угруповань мікроорганізмів є однією з основних стратегій їхнього виживання не тільки в навколишньому середовищі, але й у макроорганізмі. Дослідженням у цій галузі приділяється значна увага науковців, оскільки здатність патогенних бактерій до плівкоутворення створює суттєві проблеми у клінічній практиці: істотно підвищується стійкість до дії антимікробних препаратів та факторів імунного захисту макроорганізму. На цей час відомо, що біоплівки характеризуються етапністю розвитку, наявністю позаклітинного матриксу та здатністю до саморегуляції внаслідок міжклітинної комунікації (системи *quorum sensing*), що дозволяє обрати принципово нові мішені для антибіоплівкової терапії [97].

Застосування лазерної конфокальної мікроскопії, електронної мікроскопії, дозволило встановити, що біоплівки мають складну тривимірну структурну організацію [98]. Склад матричного слизу варіюється залежно від присутніх в ньому мікроорганізмів і включає полісахариди, білки, гліколіпіди та бактеріальну ДНК. Водночас основним його компонентом є полісахариди

(декстран, гіалуронова кислота, целюлоза та ін.). За даними, отриманими різними дослідниками, ця фракція становить 40-95% від загальної маси біоплівки; вміст інших хімічних речовин значно варіюється і залежить від таксономічної одиниці бактерії, що утворює біоплівку [99]. Частка білків у біоплівці може становити до 60%, ліпідів – до 40%, нуклеїнових кислот – 120%. Близько 80-90% обсягу біоплівок займає вода, тому всі її складові знаходяться в гідратованому стані. Матрикс біоплівки розділений каналами, наповненими водою, має порожнини. Через канали транспортуються поживні речовини та проходять потоки кисню від зовнішніх до внутрішніх частин біоплівки, одночасно з цим виводяться метаболіти бактеріальних клітин [100].

Біоплівка *S. aureus* має високу стійкість до антибіотиків. Одна з гіпотез, яка пояснює це, полягає в тому, що матриця біоплівки захищає вбудовані клітини, діючи як бар'єр, що запобігає проникненню антибіотиків. Однак, матриця біоплівки складається з безлічі водних каналів, тому ця гіпотеза стає все менш ймовірною. А втім, матриця біоплівки, можливо, містить ферменти, як-от β -лактамази, що розщеплюють антибіотики [101]. Інша гіпотеза полягає в тому, що умови в матриксі біоплівки сприяють утворенню клітин-персистерів, які є високо резистентними до антибіотиків бактеріальними клітинами [102].

Біоплівки *S. aureus* також мають високу стійкість до імунної відповіді хазяїна, точна природа якої невідома. Вони збільшуються в розмірах у присутності цитокінів, які продукуються імунною відповіддю господаря [103].

Найважливішим елементом у процесі адгезії стафілококів є полісахарид, який бере участь як у клітинній субстратній адгезії, так і в подальшому формуванні клітинних кластерів. ПМА (полісахаридна міжклітинна адгезія) ініціює гемаглютинацію і перешкоджає фагоцитозу шляхом активації бактеріальної агрегації [104]. Ще одним вивченим компонентом

екзоплазматичного компартменту є α -токсин стафілококів, який кодується як геном *hla* α -токсин [105].

Мутанти з порушеним біогенезом α -токсину або ПВА не здатні формувати повноцінні біоплівки. Також на перших стадіях формування біоплівок стафілококів значну роль грають ПБ-білки (білок, пов'язані з біоплівкою), *n*-ацетилглюкозамин, тейхоеві кислоти [106]. За процеси адгезії, синтезу ПВА та інших структурних компонентів матриксу біоплівок відповідає *ica*-оперон, що знаходиться в складній системі генетичної регуляції, яка охоплює також експресію факторів вірулентності [107].

У багатьох видів стафілококів, а також серед деяких інших грампозитивних мікроорганізмів виявлений *icaADBC*-локус. Всі перераховані вище синтезовані компоненти специфічно взаємодіють з субстратами, здійснюють якірну функцію та ініціюють подальші процеси утворення біоплівок. Після незворотної адгезії популяція мікроорганізмів починає інтенсивно проліферувати з утворенням багатоклітинних шарів і синтезувати компоненти екзополімерного матриксу, що є одним з ключових моментів утворення біоплівок [100].

1.4 Моніторинг якості молока та здоров'я вимені корів в Україні

Якість молока та здоров'я вимені – 2 поняття, які тісно пов'язані між собою. Зазвичай якість молока залежить від здоров'я вимені в стаді, що своєю чергою пов'язане з практикою доїння. Загалом у світі існує кілька стратегій моніторингу здоров'я вимені: відбір проб молока з цистерни та відбір індивідуальних зразків молока [108]. Для моніторингу якості молока регулярно проводиться підрахунок бактерій групи кишкової палички та загальної кількості бактерій, соматичних клітин в молоці [109].

Зараз всі вимоги до якості молока регулюються *ДСТУ 3662:2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови*. Він передбачає поділ молока залежно від

його фізико-хімічних і мікробіологічних показників на 3 гатунки: екстра гатунок (кількість мікроорганізмів – менше 100 тис. КУО/см³, соматичних клітин – менше 400 тис./см³); вищий гатунок (кількість мікроорганізмів – менше 300 тис. КУО/см³, соматичних клітин – менше 400 тис./см³); перший гатунок (кількість мікроорганізмів – менше 500 тис. КУО/см³, соматичних клітин – менше 500 тис./см³) [158].

Молоко найвищої якості коштує в середньому на 2 гривні більше, ніж молоко першого сорту. Молоко-сировина екстра-класу є базою для виробництва молочних продуктів, призначених на експорт, і користується підвищеним попитом [159].

Національні стандарти можуть відрізнятися залежно від країни та регіону. Наприклад, Нова Зеландія, Австралія, Канада та Європейський Союз (ЄС) прийняли мінімальний поріг для екстра класу до 100 тис. клітин / мл. У США нормативний поріг становить до 200 000 клітин / мл. (див таб 1.4) [110].

Ферми які дотримуються програм удосконалення молочного стада та програм боротьби з маститом, часто проводять індивідуальні підрахунки СК із використанням мікробіологічної діагностики для ідентифікації патогенів. Індивідуальними показниками здоров'я вимені є: частота випадків клінічного маститу, КСК, специфічність поширеності патогенів та частота випадків нових внутрішньовим'яних інфекцій [108].

В Україні програми покращення якості молока зазвичай не передбачають відстеження стада. А проте, переробними компаніями проводиться систематичний відбір проб із загальної цистерни молока з метою йлшл санітарної оцінки. З іншого боку, більша частина інформації про стан здоров'я вимені та якість молока є результатом скоординованих зусиль молочної промисловості та наукового сектору [111].

Бактерії мають різний вплив на якість молока та здоров'я вимені. Наприклад, корови у стадах, де є проблеми з контагіозним збудником, зазвичай мають

вищий коефіцієнт запалення сухожилів, але меншу кількість клінічних випадків маститу. На противагу цьому в стадах, де переважають бактерії з навколишнього середовища, спостерігається збільшення кількості клінічних випадків маститу [112].

Таблиця 1.2.

Порівняння стандартів якості молока, якість / сорт [110, 159]

Кількість соматичних клітин, тис./см ³	Бактеріальна забрудненість, тис. кл./см ³	США	ЄС	Росія	Україна
< 100	< 5	A (0,28)			
	< 30		чудове (0,36)		
	< 50	B (0,25)			
100-200	30-50		хороше (0,33)		
< 200	< 10	C (0,22)			
200-300	50-30	неякісне	середнє (0,3)		
< 300	< 100			Вищий сорт	
<400	<100			I сорт	екстра гатунок
< 400	< 300				вищий гатунок
350-400	300-500		задовільне (0,28)		
> 500	> 500		неякісне		I гатунок
501-1000	501-4000			II сорт	
< 600	< 500				
< 800	< 3000				

Що стосується *St. agalactiae*, збільшення кількості соматичних клітин в цистерні залежить від поширеності цього організму в стаді, яка часто є високою через його контагіозну природу [113]. Інфікування окремої корови *St. agalactiae* зазвичай характеризується вищим КСК, ніж за умови інфікування *S. aureu* [112]. Крім того, цей патоген може впливати на цілісність молочного білка. Дослідження *in vitro* показало, що казеїни деградували до 75% у молоці, інокульованому *St. agalactiae* [114]. Як результат, *St. agalactiae*

визнаний патогеном, який швидко поширюється в межах стада і має глибокий вплив на якість молока.

1.5 Лабораторна діагностика маститу великої рогатої худоби

Відомо 2 основні методи відбору проб для виявлення інфекційного збудника: збірна проба молока з танкера та індивідуальні проби від корів [113]. Збірний зразок – це проба молока з кожної чверті. Відбір проб з інфікованої залози – стандартна процедура діагностики внутрішніх інфекцій вимені. Індивідуальні проби від корів – зразки, отримані безпосередньо від кожної чверті вимені корови. Взяття зірної проби молока з танкера може рекомендуватися для великих стад; однак чутливість та специфічність результатів її вивчення можуть не відповідати дійсності [114].

Повідомлялося, що чутливість молекулярних методів діагностики, зокрема ПЛР, є вищою, якщо порівнювати зі звичайними методами культивування [113][116]. Молекулярні методи дедалі частіше використовуються для діагностики маститу з метою виявлення детальніших характеристик, як-от гени стійкості до антибіотиків, а також вибагливих бактерій, непридатних для культивування [117]. У клінічних зразках за допомогою ПЛР-дослідження виявлено більшу кількість контагіозних збудників, які були негативними після бактеріологічного дослідження [117]. Однак, рекомендується бути обережним під час збору зразків, оскільки під час проведення ПЛР-дослідження забруднення специфічною бактеріальною ДНК може бути трактовано як позитивна реакція [113], особливо у випадках із діагностикою мікоплазму у тварин [116].

Імунологічна серологічна діагностика також є надійним та недорогим методом виявлення збудників маститу, але вони розроблені лише для обмеженої кількості мікроорганізмів: *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Listeria monocytogenes* [118].

Результати бактеріологічного дослідження багато в чому мають сенс: вони забезпечують цілеспрямоване використання антибіотиків, інформують про резистентність збудників тощо. Основними вимогами до мікробіологічного дослідження є взяття проб молока в асептичних умовах та перед початком терапії антибіотиками [119].

Крім того, момент відбору проб має великий вплив на результати бактеріологічного дослідження. Проби молока відбирають перед початком доїння [120].

Якщо під час бактеріологічного дослідження коров'ячого молока виділяють понад 2 збудники маститу (при субклінічній формі) та 3 збудники (при клінічній формі), то такий зразок виключають з подальшого аналізу, оскільки вважають його забрудненим екзогенною мікрофлорою. З огляду на це, під час забору рекомендовано використовувати загальні методичні рекомендації для відбору зразків для бактеріологічного дослідження.

Для діагностики захворювань молочної залози ВРХ, зокрема маститів, викликаних *Prototheca zopfii*, використовують також молекулярно-генетичні дослідження та імуоферментні тест-системи [121-122].

1.5.1 Гігієна доїння та гігієнічні засоби для дезінфекції та догляду за дійками корів

Для профілактики розповсюдження бактеріальних збудників та зниження концентрації соматичних клітин в молоці на фермах рекомендовано застосовувати спеціальні засоби для обробки вимені корів [123].

Гігієна доїння – це практика дотримання гігієнічних вимог під час доїння. Яка передбачає:

- використання спеціальних засобів по догляду та дезінфекції дійок до та після доїння,
- використання одноразових рушників для висушування та очищення вимені,

- здійснення доїння в нітрилових або латексних рукавичках для запобігання накопичення бактерій на руках,
- належне очищення доїльного обладнання [124, 125].

Контроль за умовно-патогенними збудниками маститу здійснюється загалом за допомогою дотримання гігієни довкілля, оскільки кількість бактерій безпосередньо впливає на передачу інфекції. Зокрема, існують дослідження, які підтверджують позитивну кореляцію між кількістю бактерій, наявних у підстилці, та кількістю бактерій, які присутні на дійках [126].

Оскільки підстилка – це основне джерело інфекції, органічні підстилки, як-от солом'яний компост і тирса, забезпечують кращі умови для розмноження патогенної мікрофлори у порівнянні з неорганічними підстилками, наприклад, піском [127].

З огляду на те, що бактерії в підстилці можуть спричинити розвиток внутрішніх інфекцій вимені, важливо, щоб тваринам, які знаходяться в стійлах, підстилку змінювали кожні 12-14 годин [128].

Обробка дійок дезінфекційними засобами перед доїнням зменшує ризики захворюваності на мастит збудниками, які поширені в навколишньому середовищі. З'ясовано, що завдяки цьому кількість випадків інфікування коліформними та ескулін-позитивними стрептококами у порівнянні з контрольною групою зменшується на 51,5% [129].

Коагулазонегативні стафілококи можливо контролювати розповсюдження в доїльному залі за допомогою дотримання гігієнічних норм під час доїння.

Головну роль відіграє обробка дійок до та після доїння. Показано також, що внаслідок проведеного 16-тижневого дослідження, встановлено, що обробка дійок після доїння спеціальними засобами по догляду та дезінфекції дійок призводить до зменшення кількості випадків інфекцій вимені коагулазонегативними штамами стафілококу (BVI КНШС) [130].

Хоча було продемонстровано, що обробка після доїння ефективно знижує кількість випадків внутрішніх інфекцій вимені . Збудники контагіозного маститу можливо контролювати розповсюдження в доїльному залі за допомогою дотримання гігієни доїння та діагностики носіїв інфекції.

Дотримання гігієнічних норм під час доїння з метою запобігання захворюванню корів на мастит практикується упродовж багатьох років. Доведено, що обробка дійок за допомогою дезінфекційного засобу після доїння має чи не найбільше значення для боротьби з маститом. Дослідники відзначають, що у тварин, вим'я яких до та після доїння перестали обробляти дезінфекційним засобом, частота захворюваності на мастит, викликаний *Staphylococcus aureus*, становила 100%, *Corynebacterium bovis* – 57,9%, а кількість випадків захворювання на мастит, викликаний КНШС, зросла на 82% [131].

Експозиція дезінфекційного засобу відіграє важливу роль в ефективності боротьби з бактеріями. Існує багато різних класів активних інгредієнтів, які використовуються в дезінфекційних засобах для обробки дійок [132].

Відомо що, широко розповсюдженим є комплекс полівінілпіролідон йоду з активним йодом, що володіють антисептичною, дезінфекційною, протигрибковою та антипротозойну дію та блокують аміногрупи клітинних білків. Активний відносно бактерій (в т.ч. кишкової палички, золотистого стафілокока), грибів, вірусів, найпростіших [133]. Полівінілпіролідон належить до йодоформів, які зв'язують йод. Під час контакту зі шкірою та слизовими оболонками йод поступово і рівномірно вивільняється, чинячи бактерицидну дію на мікроорганізми [134].

Використання йодоформів обумовлено широким спектром чутливих до них збудників маститу, їхньою ефективністю за умов наявності великої кількості органічних речовин, а також тим, що вони зазвичай не дратують шкіру дійок [135]. Після застосування на шкіру дійок корови виділяється

активний йод, котрий взаємодіє з білками мікроорганізмів, сприяє її коагуляції. Під час контакту зі шкірою повідон йод поступово і рівномірно вивільняється. Оскільки молекули полівінілпіролідону внаслідок великого розміру не всмоктуються в кров, він чинить місцеву дію. Загалом же він забезпечує надійний захист вимені від зараження та забруднення [134].

Другий клас який широко застосовується на господарствах це сполуки хлоргексидину. вбиває широкий спектр мікроорганізмів та здатна підтримувати свою ефективність при наявності великої кількості органічних речовин. Молекули хлоргексидину взаємодіють з фосфатними групами на поверхні бактеріальної клітини, внаслідок чого відбувається зміщення осмотичної рівноваги, порушення цілісності бактеріальної клітини та її загибель [135].

Отже, вказані дезінфекційні засоби діють насамперед завдяки дії дифузії по клітинній мембрані та згортання білків у цитоплазмі. Також відомо що, використання 1% розчину пероксиду водню як дезінфекційного засобу для дійок для молочної промисловості перед доїнням також запобігає інфікуванню молочної залози та допомагає уникнути залишків дезінфекційних засобів в молоці [136]. Крім того, дезінфекційними засоби на основі пероксиду водню та молочної кислоти і комбінації біорозкладних павів, можуть допомогти поліпшити стан шкіри дійок (підсилити клітину проліферацію), посилюючи їх десквамацію, що зменшує здатність бактерій колонізувати шкіру [133,137,138].

Отже, боротьба з маститом на господарствах передбачає контроль за розповсюдженням його збудників шляхом вчасного діагностування хвороби та належного її лікування антимікробними препаратами, до яких бактерії мають чутливість, а також вживання профілактичних заходів, як-от дотримання гігієнічних норм до, під час і після доїння корів та покращення менеджменту на господарствах [139,140].

На підставі наведених у літературі даних обґрунтована необхідність пошуку нових біотехнологічних методів діагностики субклінічного маститу та контролю циркуляції збудників. Було з'ясовано, що у тварин у яких зустрічались субклінічні запальні процеси вим'я виникають внаслідок недотримання періодичності доїння та несправності доїльного обладнання, що спричиняє неповному видоюванню та травматизації дійок, внаслідок підвищеного вакуумного тиску [160].

Підсумовуючи наведену інформацію в даному розділі огляду слід зазначити, що комплексне застосування діагностичних методів діагностики контагіозних мастита та раціональне використання антибіотиків при запальних процесах вимені корів, також використання засобів для догляду вим'я корів та профілактики розповсюдження умовно-патогенних бактерій на фермі дозволить посилити імунну функцію молочної залози, нормалізувати окисно-відновний баланс, посилити бактерицидну дію, покращити харчову та екологічну якість молока [156].

РОЗДІЛ 2.

ОБ’ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ, РЕАКТИВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Відбір зразків та схеми дослідження

Бактеріологічне дослідження молока корів проводили зі зразків біологічного матеріалу від корів, які надходили на дослідження в ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» у лабораторію бактеріології та патанатомії у період з 2015-2016 р.

Для молекулярно-діагностичних досліджень відбір проб молока для аналізу відбувався з ферм України від корів, які мали запалення репродуктивної системи зразки відібрані у період з 2016-2017 р.

Визначення активності ферменту лактатдегідрогенази та кількості соматичних клітин (зразки відбирались у період 2016-2017 р.) проводили за наступною схемою:

Таблиця 2.1.

СХЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ

Первинне дослідження проводили на фермі ДП «КРАСНОСІЛЬСЬКЕ-МОЛОКО». Чернігівська обл., Борзнянський р-н, с.Красносільське, на двох групах корів (2–3 лактації) по 10 тварин у кожній

1. Для визначення ураженої чверті молочної залози корів застосовували каліфорнійський тест.
2. Для визначення кількості соматичних клітин у молоці враженої долі вимені корів застосовували експрес-тести PortaSCCtm. США

КОНТРОЛЬНА ГРУПА

кількість соматичних клітин у клінічно здорових тварини (10) молоці не перевищувала 200 тис. /см³

клінічно хвора 1 тварина (клінічний мастит) соматичні клітини понад 1000000 тис. /см³

ДОСЛІДНА ГРУПА

кількість соматичних клітин у молоці корів перевищувала 200 тис. /см³ (тварини з субклінічною формою маститу)

3.Вимірювали активність ферменту лактатдегідрогенази застосовували експрес-тести UdderChecktm (США).

4.Відбирали проби молока для мікробіологічних досліджень

Проби відбирали від корів породи Джерсей віком 3-5 років. Усі тварини знаходились у другій-третій фазі лактації. Для визначення ураженої чверті молочної залози застосовували каліфорнійський тест для визначення маститу. У пробах незбираного молока корів визначали концентрацію соматичних клітин експрес-методом : контрольна група — кількість соматичних клітин не перевищувала 200 тис./см³, дослідна група — кількість соматичних клітин знаходилась в межах від 250 тис. до 1 млн. у 1 см³.. Вимірювали активність ферменту лактатдегідрогенази. Після встановлення характеру інфікування протирали кінчик дійок 70 °С спиртом, здоювали перші цівки молочного секрету та асептично відбирали зразок в пластиковий контейнер, відмічали номер корови для подальшого аналізу.

2.1.1 Для визначення клітинного осаду молока методом протокової цитометрії

Проби молока у доїльному залі ДП «КРАСНОСІЛЬСЬКЕ-МОЛОКО». Чернігівська обл. відбирали від корів породи Джерсей віком 3-5 років. Усі тварини знаходились у другій-третій фазі лактації. Усі зразки молока були відібрані з дотриманням правил асептики в стерильні пляшки по 30 мл доставляли в лабораторію при температурі 4-8°C не довше 8-12 годин.

Таблиця 2.2.

СХЕМА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослід проводили на 20 корів породи Джерсей віком 3-5 років
Для визначення враженої чверті молочної залози застосовували каліфорнійський мастит тест.
Усі зразки молока корів були відібрані (негативна реакція на каліфорнійський тест) з дотриманням правил асептики в стерильні пляшки по 30 мл доставляли в лабораторію при температурі 4-8°C не довше 8-12 годин. Для подальшого аналізу.

2.2 Використані в роботі матеріали та реактиви:

- набір для виділення ДНК «Рибо-сорб» (Амплісенс, Росія), до складу якого входять: розчин для лізису, розчин для відмивання 1, розчин для відмивання 3, розчин для відмивання 4, сорбент універсальний, РНК-буфер;
- набір для виділення РНК і ДНК «MagVet Universal Isolation Kit», склада якого входять розчини: N1, M1, NM2, NM3, NM4, NM6 і NM LSI Beads;
- набір реактивів і матеріалів для проведення ПЛР: деіонізована вода, суміш дезоксінуклеотидтрифосфати (10 мМ dNTP-mix (Thermo Scientific, США), DreamTaq ДНК-полімераза (5 од.ак./мкл) (Thermo Scientific, США), магній хлорид $MgCl_2$ (Thermo Scientific, США), олігонуклеотиди-специфічні праймери F і R (ОПС очищення), ПЛР-буфер (10 X буферний розчин DreamTaq Green Buffer) (Thermo Scientific, США);
- набір для проведення електрофорезу: Top Vision агароза для електрофорезу (Thermo Scientific, США), трифосфатний буфер (Амплісенс, Росія), маркер молекулярних мас «O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, США);
- набір API 20 E: стандартизована система ідентифікації Enterobacteriaceae та інших невибагливих грамнегативних паличок, яка використовує 21 мініатюризований біохімічний тест та базу даних. API NaCl 0,85% середній, 5 мл або суспензія API середня, 5 мл. Набір реагентів API 20 E або окремі реагенти: TDA JAMES, VP 1 + VP 2, NIT 1 + NIT 2, реактив Zn, оксидаза, мінеральна олія, індекс аналітичного профілю API 20 E або програмне забезпечення для ідентифікації;
- чашки Петрі з кров'яним агаром;
- пробірки (100x15 мм.) об'ємом 2,6 мл для стерильного фізіологічного розчину (для кожного штаму 2 пробірки);

- реактив для тесту фосфатази,
- реактив для тесту на нітрати,
- парафінове масло, стерильне,
- ВПтест, реактив для тесту ацетоїна (для ВП тесту).

2.2.1 Обладнання

Ламінарний бокс 2 класу біологічної безпеки (Telstar, Іспанія), бокс абактеріального повітряного середовища (Lamsystems, Росія), екстрактор нуклеїнових кислот «Bead Retriever» (Invitrogen, США), термостат для мікропробірок на 25-100°C (Біоком, Росія); вакуумний відсмоктувач (Biosan, Росія), Мікроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина); центрифуга-вортекс (Біоком, Росія); автоматичні мікродозатори на 2.5, 10, 20, 100 і 1000 мкл (Eppendorf, Німеччина), термоциклер (Ампліфікатор) (SimlyAmp, Applied Biosystems, США); камера для горизонтального електрофорезу (Scie-Plas, США); ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів (Vilber Lourmat, Німеччина); термостат (35-37°C) та звичайне оснащення мікробіологічної лабораторії (мікробіологічні петлі, маркувальні олівці); денсіламетр II (Ном. номер INS00062) або пробірки з суспензією 2 ступені каламутності за шкалою McFarland (0,2 мл 1% розчину $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 9,8 мл 1% розчину H_2SO_4) 1 штатив для пробірок 1 Автоматична мікропіпетка (об'ємом 0,1 мл), стерильні наконечники 1.

2.3 Молекулярно-біологічні методи дослідження

2.3.1 Підбір праймерів для проведення ПЛР

Для виявлення генетичного матеріалу бактерій роду *Mycoplasma spp.* в зразках молока використовували in-hous ПЛР. Праймери підбирали, аналізуючи рівень їхньої гомології до матриці, для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Праймери були валідовані на тестовому штамі *Mycoplasma spp.* (Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів), відібраному шляхом аналізу рівня гомології до обраного шаблону ДНК збудника:

F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'

R: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'

2.3.2 Виділення ДНК з біологічного матеріалу за допомогою набору «Рибосорб».

Прогріли розчин для лізису за температури 56°C до повного розчинення кристалів. Відібрали необхідну кількість пробірок, включно з пробіркою для негативного контролю реакції (К), промаркували їх і в кожную накапали по 450 мкл розчин для лізису. У пробірки з розчином лізису додали по 100 мкл проби. Потому додали негативний контроль (ОКО), використовуючи носи́ки з аерозольним бар'єром і інтенсивно перемішали на вортексі.

Ресуспендували сорбент, інтенсивно перемішуючи його на вортексі. Далі, не торкаючись пробірок, в кожную окремим носи́ком внесли по 25 мкл сорбенту, після чого вміст пробірок перемішали та залишили в штативі на 1 хв. Знову перемішали на вортексі та залишили в штативі для осідання сорбенту на 7-10 хв. Відтак перемішали сорбент на вортексі при 10 тис. об./хв протягом 30 сек.

Видалили над осадну рідину, використовуючи вакуумний відсмоктувач і стерильні носи́ки без фільтра.

Після цього провели відмивання сорбенту. На першому етапі в пробірки з обложеним сорбентом додали по 400 мл розчину для відмивання 1, ресуспендували сорбент на вортексі, центрифугували проби при 10 тис. об./хв протягом 30 сек. і видалили надосадову рідину вакуумним аспіратором.

Наступні етапи здійснювалися за такою ж схемою. На другому і третьому етапі додали в пробірки по 500 мл розчину для відмивання 3, на четвертому етапі – по 400 мл розчину для відмивання 4. Потім пробірки з відмитим сорбентом помістили на 10 хв у термостат (60°C) для підсушування сорбенту.

Після цього отримали елюцію нуклеїнових кислот. Для цього в проби додали по 50 мкл РНК-буферу, перемішали їх на вортексі та помістили на 5 хв у термостат (60°C). Відтак центрифугували проби протягом 90 сек. при 13 тис. об./хв. Зберігали при температурі (-20°C) до постановки реакції ампліфікації.

2.3.3 Виділення нуклеїнових кислот за допомогою екстрактора «Bead Retriever»

Використовували екстрактор «Bead Retriever» і набір реагентів «MagVet Universal Isolation Kit». Спочатку в штатив для екстрактора поміщали пластикові стріпи на 5 лунок. Потім у лунки вносили реагенти (порядок внесення та обсяг реагентів зазначено в таблиці 2.3.3).

Таблиця 2.3.

Порядок внесення та обсяг реагентів, які використовуються для виділення нуклеїнових кислот

№ з/п	Реагент	Номер лунки	Об'єм, мкл
1	NM1 (N1 + M1) (буфер для лізису)	1	250 мкл
2	NM3 (розчин для відмивання)	2	600 мкл
3	NM4 (розчин для відмивання)	3	600 мкл
4	80% етанол	4	600 мкл
5	NM6 (буфер для елюції НК)	5	80 мкл
6	NM2 (буфер для зв'язування НК)	1	600 мкл
7	NM LSI Beads (магнітні кульки)	1	20 мкл

У першу лунку з розчином для лізису (NM1) додали 100 мкл молока. Потім по черзі внесли розчини: NM3, NM4, 80% етанол і NM6. Після цього штатив зі стрипами помістили на 10 хвилин в екстрактор для лізису зразка.

Після завершення лізису в першу лунку додали розчин для скріплення нуклеїнових кислот NM2 і NM LSI Beads (магнітні кульки). Потім знову помістили штатив на 35 хвилин в екстрактор, де відбувалося виділення ДНК і РНК. Через 35 хв. із 5-ї лунки відібрали в пробірки виділену ДНК. Пробірки зберігали за температури -20°C до постановки реакції ампліфікації.

2.3.4 Проведення полімеразної ланцюгової реакції

Приготували потрібну кількість проб із розрахунком на позитивний і негативний контроль реакції. Потім приготували ПЛР-суміш, склад якої наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.4

Об'єм реагенту для внесення ПЛР-суміші

Реагент	Об'єм
Деіонізована вода	38 мкл
Дезоксінуклеотидтрифосфат (dNTP-mix)	0.5 мкл
Передній праймер F	0.3 мкл
Задній праймер R	0.3 мкл
Магній хлорид (MgCl ₂ ⁺)	1 мкл
ПЛР-буфер (10X буферний розчин DreamTaq Green Buffer)	5 мкл
ДНК-полімераза DreamTaq	0.25 мкл

Приготовану ПЛР-суміш внесли в пробірки по 45 мкл. До реакційної суміші внесли по 5 мкл досліджуваного зразка ДНК і контролів (К +) і (К).

Запрограмували термоциклер (ампліфікатор) згідно з температурним режимом, наведеним у таблиці 2.3.

Таблиця 2.5

Проведення електрофорезу продуктів реакції в агарозному гелі

.

Етап	Температура, °C	Час	Кількість циклів
гарячий старт	95	2 хв.	1
денатурація	95	30 сек.	41
віджиг	61	30 сек	
елонгація	72	30 сек	
кінцева елонгація	72	1 хв	1

Після закінчення реакції провели електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації в агарозному гелі (1,7%). Для цього 1,7 гр. агарози насипали в колбу з термостійкого скла на 250 мл. Додали 100 мл робочого ТБЕ-буферу, перемішали обертанням колби та плавили в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози. Час плавлення агарози в мікрохвильовій печі з потужністю 600 Вт за умови її завантаженості 1 колбою – 2 хв. Вийняли колбу з розплавленою агарозою з мікрохвильової печі, обертаючи її, акуратно перемішали вміст. Після цього знову помістили колбу в мікрохвильову піч на 2 хвилини, довели агарозу до кипіння. Вийняли колбу з мікрохвильової печі, обертаючи її, остудили вміст до 65-70°C. Підготували камеру для проведення електрофорезу, встановивши гребінки, не торкаючись дна форми, на відстані не менше 3 см один від одного. Залили розплавлену агарозу в форму камери для електрофорезу, товщина гелю складала 0,6 см. Після повного застигання гелю (30 хв за кімнатної температури) помістили підкладку з готовим гелем у камеру. Лунки розташовувалися ближче до негативного електроду, оскільки ДНК рухається до позитивного заряду. Залили в камеру стільки готового буферу, щоб він покрив гель шаром товщиною 5 мм. Обережно вийняли з нього гребінки, не пошкодивши лунки. Пробірки з продуктами ампліфікації виставили в штатив, внесли в лунки гель під буфер, по 10 мкл амплікону змінюючи для кожного зразка наконечник. У кожному рядку доріжок гелю був наявний позитивний контроль (K+), негативний контроль (K-) і маркер молекулярних мас ДНК «GeneRuler 50bp DNA Ladder» (Fermentas). Під'єднали камеру до джерела струму, дотримуючись полярності та включили джерело. Під час використання камери параметри джерела були наступні: напруга – 100 В, стабілізація по напрузі, час електрофорезу – 45 хв.

Оптимальна напруженість електричного поля складала 10 В/см. Після завершення електрофорезу вимкнули джерело струму, перенесли гель на транслюмінатор «Vilber Lourmat», розташували смуги горизонтально лунками вгору. Переглянули гель в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 320 нм) і сфотографували через спеціальне скло транслюмінатора.

2.3.5 Облік результатів ПЛР-аналізу в агарозному гелі

Облік проводили відповідно до наявності або відсутності на електрофореграмі специфічної смуги ампліфікованої ДНК. Позитивними вважали зразки, які містять специфічну смугу, що світиться на рівні 717 п.н. Негативними – ті, які після ампліфікації не містять смугу 717 п.н. Після використання буфер і гелі, що містять розчин етідіум броміду, дезактивували, додаючи 500 см³ 0,5 М КМnО₄ і 500 см³ 2,5 М НСl.

2.3.6 Проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

Для визначення *Mycoplasma bovis* використовували тест-систему «LSI VetMAX™ Screening Pack Real-Time PCR Kit, респіраторні захворювання жуйних тварин» (Франція).

Для постановки ПЛР-реакцій до 20 мкл готової суміші ПЛР (3-Mix SRRR M. bovis) додали 5 мкл екстрагованої дослідної ДНК, в контрольних лініях – 5 мкл негативного контролю та 5 мкл позитивного контролю реакцій.

Ампліфікацію виконано на 7500 PCR-системі швидкого реального часу Applied Biosystems (США).

Програма для запуску термоциклеру:

- 1 цикл – попередня денатурація упродовж 10 хвилин за температури 95°C;
- 2 цикл – денатурація упродовж 15 секунд за температури 95°C;
- 3 цикл – віджиг упродовж 1 хв. за температури 60°C.

Детектор: FAMtm dye / Green-*Mycoplasma bovis*, ендогенний контроль VIC.

Інтерпретація результатів досліджень ПЛР в реальному часі. Інтерпретація результатів здійснювалася шляхом аналізу кривих, отриманих термоциклом, виходячи з наявності чи відсутності перетину кривої флуоресценції з пороговою лінією, встановленою на певному рівні. Вибірка вважалася позитивною, якщо значення Ct на каналі FAM/Green було менше за 45. Зразок вважався негативним, якщо на каналі FAM/Green не було кривої флуоресценції, натомість була виявлена крива флуоресценції VIC/каналу, а значення Ct було менше за 45 (контроль внутрішньої ендогенної реакції).

2.4 Підбір поживних середовищ для культивування. Проведення та інтерпретація бактеріологічного дослідження

Для виділення з досліджуваних проб молока аеробних бактерій використовували неселективний *кров'яний агар bioMerieux* (Франція). Також для попередньої ідентифікації та селективної ізоляції були використані: *агар Макконкі* (для виділення грамнегативних бактерій), *маннітол-солевий агар* (як селективне та диференціальне середовище для виділення стафілококів), *агар Едвардса* (для швидкої ізоляції *Streptococcus agalactiae* та інших стрептококів), *агар Сабуро* (для культивування дріжджів, пліснявих грибків) (Індія та Італія). За допомогою мікродозатора вносили 0,1 мл. зразку молока, розподіляли його за фламбованою петлею штрихом по поверхні агару та інкубували в термостаті упродовж 12-18 годин. Після інкубування проводили фарбування бактерій за методом Грама для підтвердження однорідності культури, якщо бактеріальна культура зміщена, то проводили виділення чистої культури бактерій.

Для ідентифікації в *агарі Макконкі* бактеріальних ізолятів, характерних для *E. coli*, використовували *MIKRO-LA-TEST®* (Чехія). *Coli тест* – це

високоспецифічний тест для ідентифікації кишкової палички, заснований на визначенні бета-глюкуронідазної активності та продукції індолу. Фермент бета-глюкуронідази (ГЛП) розщеплює 4-метилумфеліл-бета-D-глюкоронід із вивільненням 4-метилумфеліферона, який дає голубу флюоресценцію, видиму в ультрафіолеті. Продукція індолу (ІНД) з L-триптофани виявляється появою червоного кольору після додавання реактиву для тесту ІНДОЛ. Смужку занюрювали в суспензію досліджуваного штаму та інкубували протягом 4 годин. Результати визначали візуально за допомогою УФ лампи з довжиною хвилі 366 нм. (позитивна реакція – голуба флюоресценція) Відтак додавали реактив для тесту ІНДОЛ (суспензія забарвлювалась в червоний колір).

Для проведення бактеріологічного дослідження (у розділ №5) підбір поживних середовищ проводили шляхом аналізу попередніх досліджень з досліджуваної ферми. Було відомо, що в досліджуваному фермерському господарстві циркулювали контагіозні збудники бактерій. Тому для експрес виділення використовували селективні, хромогенні середовища.

ChromArt Strepto В середовище для виділення стрептококів групи В (*S.agalactiae*) з клінічних зразків і для диференціації колоній на основі типового кольору. Селективність заснована на присутності в середовищі суміші антибіотиків. Диференціальні характеристики засновані на конкретних ферментативних реакціях, які дозволяють диференціювати колонії

St.agalactiae (рожево-пурпурного) від інших бактерій, що не відзначаються селективними речовинами (наприклад, *Enterococci*), які ростуть зелено-блакитними, синіми, без або з рожевим ореолом або безбарвними колоніями.

Для виділення бактерій *Staph. aureus* використовували середовище BBL CHROMagar (Париж, Франція. Компанія BD) призначене для виділення, підрахунку та ідентифікації *S. aureus* за ознакою утворення колоній рожево-бузкового кольору через 20–24 год. інкубації.

Додавання хромогенних субстратів до середовища спрощує диференціацію *S. aureus* від інших мікроорганізмів. В середовищах джерелом поживних речовин є спеціально підібрані пептони. Для пригнічення росту грам-негативних мікроорганізмів, дріжджоподібних грибків і деяких грам-позитивних коків використовують додаткові селективні речовини. Суміш хромогенних речовин складається зі штучних субстратів (хромогенів), які в результаті гідролізу під дією певного ферменту виділяють нерозчинну кольорову сполуку. Це спрощує виявлення й диференціацію *S. aureus* серед інших мікроорганізмів. *S. aureus* використовує один із хромогенних субстратів, утворюючи колонії рожево-бузкового кольору. Утворення колоній рожево-бузкового кольору через 24 год. вказує на наявність *S. aureus*.

2.4.1 Ідентифікацію грамнегативних паличок бактерій здійснювали за допомогою комерційних тест-систем API 20E Biomerieux™ (Франція).

Перед початком роботи проводили швидкий тест на оксидазу цитохрому. Вибирали кілька ізольованих колоній (із чистої культури) та робили суспензію в стерильній дистильованій воді. Брали біохімічну тест-смужку API 20E, яка містить зневоднені біохімічні середовища / біохімічні реагенти у 20 окремих відділеннях. За допомогою Пастеровської піпетки або мікродозатора заповнювали (до краю) відділення бактеріальною суспензією. Додавали у відділення ADH, LDC, ODC, H₂S та URE стерильну олію. Поміщали у лоток кілька крапель води, клали тест-смужку API та закривали лоток. Позначали лоток ідентифікаційним номером (Ідентифікатор дослідження або Ідентифікатор зразку), дату та свої ініціали. Інкубували лоток протягом 18-24 годин за температури 37°C.

API 20E пластикова смужка вміщує 20 біохімічних реакцій, які містять зневоднені середовища та мають хімічно визначені склади для кожного тесту. Вони зазвичай виявляють ферментативну активність, пов'язану здебільшого з

бродінням вуглеводів або катаболізмом білків чи амінокислот інокульованими організмами. Для регідrataції кожної з лунок використовувалась бактеріальна суспензія. Під час інкубації метаболізм спричиняв зміни кольору, які були спонтанними або виявлялися після додавання реагентів. Усі позитивні та негативні результати тестування склалися для отримання номера профілю, який потім порівнювався з номерами профілів у комерційній кодовій книзі для визначення ідентифікації видів бактерій.

Тестовий набір дозволив проводити такі тести:

ONPG – визначення ферменту β -галактозидази шляхом гідролізу субстрату о-нітрофеніл-b-D-галактопіранозиду;

ADH – декарбоксилювання амінокислоти аргініну дигідролазою аргініну;

HPC – декарбоксилювання амінокислоти лізин декарбоксилазою;

ODC – декарбоксилювання амінокислоти орнітин декарбоксилазою;

CIT – використання цитрату як єдиного джерела вуглецю;

H₂S – отримання сірководню;

Сечовина – визначення ферменту уреази;

TDA (триптофандезаміназа) – виявлення ферменту триптофан дезамінази (реагент – хлористе залізо);

IND – визначення індолу (виробництво індолу з триптофану ферментом триптофанази; реагент – індол виявляється додаванням реагенту Ковача);

VP – тест Voges-Proskauer для виявлення ацетоїну (ацетилметилкарбінолу), що виробляється ферментацією глюкози бактеріями за допомогою шляху бутіленгліколю;

GEL – тест на вироблення ферменту желатинази, який розріджує желатин;

GLU – бродіння глюкози (гексозного цукру);

MAN – бродіння маннози (гексозного цукру);

INO – бродіння інозитулу (циклічний багатоалкогольний спирт);

SOR – бродіння сорбіту (спиртового цукру);

RHA – бродіння рамнози (метилпентозного цукру);

SAC – бродіння сахарози (дисахариду);

MEL – бродіння мелібіози (дисахариду);

EMI – бродіння амігдаліну (глікозиду);

ARA – бродіння арабінози (пентозного цукру).

2.4.1 Інтерпретація результатів комерційних тест систем API 20E Biomerieuxtm

Для деяких лунок зміну кольору можна спостерігати вже через 12 годин, але до деяких лунок перед інтерпретацією слід додати реагенти.

Додали до лунок реагенти:

1. TDA. Додали 1 краплю хлориду заліза.
2. IND. Додали 1 краплю реагенту Ковача.
3. VP: Додали 1 краплю 40% KOH (реагент VP 1) і 1 краплю α -нафтол (реагент VP 2).

Отримали шкалу зчитування API (кольорову діаграму), позначивши кожен тест як позитивний чи негативний на кришці лотка. Лунки позначили триплетами чорними трикутниками, для яких виділяються бали.

Таблиця. 3.1.

Зразок шкали зчитування API

Triad	I			II			III			IV			V			VI			VII		
Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	oxidase
Reaction	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Point	1	2	4	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	2	4	0	0	4	1	0	4
Add	7			0			3			1			6			4			5		
7-digital Code	7 0 3 1 6 4 5																				

3 тестові реакції складали одночасно, щоб отримати 7-значне число, яке потім шукали в кодовій книзі. Найвищий бал за триплет – 7 (сума 1, 2 і 4), а найнижчий – 0. Ідентифікували організм за допомогою каталогу API або apiweb (онлайн).

2.4.2 Ідентифікація *Streptococcus spp.* за допомогою комерційної тест-системи MIKRO-LA-TEST®

Для ідентифікації стрептококів використовували набір *Strepto16*. Культури виділяли звичайними бактеріологічними методами на неселективному агарі крові (колумбійський агар, кров'яний агар). Оцінювали морфологію чистої культури, гемолітичну активність на агарі, проводили тести на виявлення активності піролідонілариламідази (тест PYR, смужка для виявлення PYRAtest) на наявність групового антигену (A, B, C, D, F, G). Використовували суспензію сольового розчину із чистої 24-годинної культури у фізіологічному розчині. Добре гомогенізували суспензію. Каламутність суспензії відповідала 3-му ступеню за шкалою каламутності *Мак-Фарленда*. Перед внесенням добре струшували бактеріальну суспензію за допомогою вортекса. Інокулювали 0,1 мл суспензії в перші 8 дослідних лунок (стовпці H-A першого ряду, тобто тести HIP до URE). Піпетували 1 мл суспензії до вмісту однієї ампули суспензійного

середовища для *STREPTOtest16* (вміст 1 мл). Додавали 2 краплі стерильної парафінової олії в лунки колонок першого ряду В і А (тести ARG та URE) після внесення. Щоб запобігти висиханню, стріп вкладали в спеціальний пакет, інкубували в термостаті упродовж 12-18 год. за температури 35-37°C.

Виконували ідентифікацію, використовуючи книгу кодів для набору *STREPTOtest 16* та за допомогою комп'ютерної програми ідентифікації **ErbaExpert**. Під час ідентифікації оцінювали культуру, визначали її належність до серологічної групи, гемоліз, характер колоній, мікроскопію, походження ізоляту.

Для ідентифікації *Staphylococcus spp.* проводили тест на каталазу, оксидазу та вивчали характер гемолізу на кров'яному агарі. Для ідентифікації та встановлення виду використовували набори **МІКРО-ЛА-ТЕСТ Staphy 16**. Для підготовки бактеріальної культури готували суспензію, використовували перевірену чисту 24-годинну культуру з кров'яного або з триптіказо-соевого агару. Ретельно гомогенізували суспензію. Каламутність суспензії відповідала II ступеню за шкалою каламутності McFarland.

Внесення інокулюма. Суспензію бактерій ретельно струсили. Додали по 0,1 мл суспензії в лунки відповідного дворядного стріпу, виключаючи можливість зараження сусідніх лунок. Опісля в лунки H, G, F (тести уреаза, аргінін, орнітин) додали по 2 краплі стерильного парафінової олії.

Після інокуляції накрили пластинку запобіжною плівкою, вклали пластинку в пакет з поліетилену, відкритий кінець його пакета загнули під пластинку, щоб інокулят під час інкубації не висихав. Інкубували інокульовану пластинку і контрольну чашку за температури 35-37°C протягом 24 годин, пробірку з ВПтестом – протягом 1,5 години. Потому додали по 3 краплі реактиву VPT I та VPT II в пробірку з ВПтестом, ретельно струсили та помістили в термостат на 30 хвилин. Після інкубації врахували результат ВП реакції. Через 24 години

інкубації перевірили зростання та чистоту культури на контрольній чашці (за умови відсутності росту продовжували інкубацію на 24 год.). Додали по 1 краплі реактивів у лунки: лунка В (NIT) – реактив для тесту на нітрати, лунка А (PHS) – реактив для тесту на фосфатазу. Врахували результати всіх реакцій та занесли їх у бланки досліджень.

Для ідентифікації грампозитивних паличкоподібних бактерій (*Corynebacterium spp.*) та дріжджів використовували фарбування за Грамом, проводили тест на каталазу, оксидазу та вивчали характер гемолізу на кров'яному агарі. За потреби використовували розроблені в ТОВ «Центрі Ветеринарної діагностики» біохімічні тести. Результати реакцій звіряли з довідником Берджі з бактеріологічної систематики.

Усі зразки, культури мікробів та інокульовані проби вважали інфекційними та утилізували відповідним чином. Асептична техніка та звичайні запобіжні заходи були дотримані протягом усієї процедури обробки досліджуваної бактеріальної групи.

2.4.3 Проведення аналізу на антибіотикочутливість бактерій

Чутливість до АМП виділених ізолятів ідентифікували за допомогою диско-дифузійного методу *in vitro* на агарі Мюлера-Хінтона із застосуванням стандартних комерційних дисків: амоксицилін – 25 мкг/диск, амоксицилін + клавуланова кислота – 20 мкг/диск + 10 мкг/диск, гентаміцин – 10 мкг/диск, енрофлоксацин – 10 мкг/диск, флорфенікол – 30 мкг/диск, стрептоміцин – 10 мкг/диск, триметоприм – 5 мкг/диск, ампіцилін – 10 мкг/диск, пеніцилін G – 10 одиниць, тилозин – 15 мкг/диск, неоміцин – 30 мкг/диск, лінкоміцин – 15 мкг/диск, клоксацилін – 30 мкг/диск, рифампіцин – 5 мкг/диск, бацитрацин – 10 мкг/диск, цефалексин – 30 мкг/диск (Індія та Великобританія).

Після виділення чистої бактеріальної культури переносили їх у відповідне поживне середовище або фізіологічний розчин для отримання помутніння, еквівалентного 0,5 стандарту мутності МакФарленда (сульфат барію). Стандартний готовий інокулюм перемішували на вихровому змішувачі перед кожним використанням. Для правильного регулювання помутніння використовували білий фон з контрастними чорними лініями або пристрій Денси-Ла-Метер. Інокулюм розподіляли стерильним тампоном максимально рівномірно по поверхні агару. Потім за допомогою фламбованого полум'ям пінцету в інокульоване середовище поміщали тестові диски з активною речовиною. Інкубували досліджувані матеріали протягом 18 годин за температури 37°C, після чого вимірювали діаметри зон інгібування навколо дисків у міліметрах.

Для інтерпретації результатів аналізу антибіотиків використовували таблиці пограничних значень (версія 7.1, 2017), розроблені Європейським комітетом із визначення чутливості до антимікробних препаратів.

2.4.4 Визначення бактерицидної дії засобу «Повідонпротект» (якісний аналіз)

Принцип методу. Для визначення бактерицидної дії деззасобу використовували такі тест-штами мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp.*, *Streptococcus agalactiae*. Культури мікроорганізмів вирощували на скошеному тріптіказо-соевому агарі упродовж 18-24 год за температури 37 °C, після чого проводили змив ізотонічним розчином натрію хлориду та готували завись еквівалентного за оптичним стандартом Мак-Фарленда на 0,5 одиниць. Стандартний готовий інокулюм перемішували на вихровому змішувачі перед кожним використанням. Інокулюм розподіляли стерильним тампоном максимально рівномірно по поверхні агару. Чашку Петрі

ділили на 2 зони: I – зона-контроль, II – зона-дослідний зразок. Інкубували досліджувані матеріали протягом 18 годин за температури 37°C, відтак проводили інтерпретацію результатів досліджень. Оцінку результатів досліджень проводили через 18- 24 год. Відсутність росту мікроорганізмів у пробірках вказувала на бактерицидну дію досліджуваного дезінфекційного засобу.

Загальна інформація про гігієнічний засіб Повідон протект компанії ТОВ «Санвет».

Гігієнічний засіб для дезінфекції та захисту дійок вимені корів після доїння на основі активного йоду 0.3 % (3000 ppm), повідон йоду 0.2 % (2000 ppm).

Застосовується для лікувально-профілактичної обробки дійок вимені ВРХ та іншої молочної худоби. Використовується одразу після доїння та забезпечує надійний захист вимені від інфікування мікроорганізмами та забруднення.

Утворює захисну плівку коричневого кольору, оберігаючи дійковий канал від патогенної мікрофлори та органічного забруднення до наступного доїння.

Внаслідок вмісту гліцерину та косметичних компонентів зволожує та оберігає шкіру дійок від пересихання. Алантоїн та провітамін В5 стимулює клітинну проліферацію епітеліальної тканини, що своєю чергою прискорює відновлення тканин дійок корів.

Принцип дії засобу. Після нанесення на шкіру дійок виділяється активний йод, котрий взаємодіє з білками мікроорганізмів (сприяє їх коагуляції). Володіє широким спектром протимікробної дії, активний щодо бактерій, вірусів, грибів, найпростіших, в тому числі проти основних збудників маститу, таких мікроорганізмів як *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*. При контакті зі шкірою та слизовими оболонками елементарний йод поступово та рівномірно вивільняється. Молекули повідон-йоду досить великі, вони не всмоктуються в кров, тому

препарат діє в основному місцево, неглибоко проникаючи в тканини, але дія його досить тривала через те, що активний йод повільно вивільняється з тканин і не викликає токсичності.

2.5 Визначення ферменту лактатдегідрогенази в молоці

Активність лактатдегідрогенази в молоці визначали за допомогою набору UdderCheck (США). Тест-смужку діставали пінцетом і опускали на 10 с. у відібраний попередньо з однієї чверті вимені зразок. Потім смужку витягували, а залишок молока струшували, через 2 хв. порівнювали із кольоровою шкалою на банці.

Принцип методу. Покриття тест-смужки містить іммобілізований субстрат – L-лактат. Після низки ферментативних реакцій цей субстрат окислюється ЛДГ молока, а індикатор нітротетразолієвий синій перетворюється на фіолетовий формазан. Інтенсивність забарвлення кінцевого формазану пропорційна активності лактатдегідрогенази в молоці. Результати оцінювали згідно з

Таблиця 2.5.1

Визначення рівня активності ЛДГ на основі візуальної оцінки результатів тесту

РЕЗУЛЬТАТ	ЙМОВІРНІСТЬ ІНФІКУВАННЯ	РІВЕНЬ АКТИВНОСТІ ЛДГ
–	Низька	<100 од/мкл
+	Середня	100–200 од/мкл
++	Висока	200–500 од/мкл
+++	Дуже висока	> 500 од/мкл

2.6 Визначення кількості соматичних клітин в молоці проводили за допомогою набору PortaSCC (США).

Принцип методу. Краплі молока додавали в абсорбційний отвір тест-смужки, не торкаючись смужки кінчиком піпетки. Після того, як молоко поглиналося, в той же абсорбційний отвір додавали 4 краплі (150 мкл) активаційного розчину. Через 5-6 хв кількість соматичних клітин оцінювали, порівнюючи смужку із кольоровою шкалою. Цей метод заснований на принципі ферментативної реакції естерази. Ферменти, розташовані на стінці лейкоцитів, мають естеролітичну активність. Білі кров'яні тіลця у зразках молока зберігаються у спеціальному шарі реагенту на тест-смужці, який також містить субстрат, представлений іммобілізованим барвником. Фермент естераза з лейкоцитів каталізує реакцію фарбування субстрату в синій колір, інтенсивність якого пропорційна кількості СК в зразку (детальніше див. www.portacheck.com).

2.6.1 Інтерпретація результатів досліджень

Результат вважався негативним або нульовим, якщо колір субстрату не змінився (< 100 тис.клітин в 1 мл). Якщо спостерігався світло-блакитний колір, результат вважався «одним плюсом» (200 тис. клітин в 1 мл). Якщо тестова зона мала колір морської хвилі, результат вважався «двома плюсами» (200 тис. — 500 тис. клітин в 1 мл). Синій колір тест-смужки рахувався як «три плюси» (1000 тис. клітин в 1 мл). Будь-яка зміна кольору тест-смужки, що відповідала кількості клітин понад 250, вважалася позитивним результатом.

2.7 Проведення протокової цитометрії

2.7.1 Підготовка проб молока до протокової цитометрії.

Для виділення клітин з молока зразки центрифугували упродовж 10 хвилин з прискоренням 180g. Жировий шар та надосадову рідину видаляли ватним тампоном. З метою виключення дебрису проводили мікроскопію зразків

коров'ячого молока на автоматизованому лічильнику клітин Countess II FL Automated Cell Counter.

Зразки молока центрифугували протягом 15 хв з прискоренням 200g і за температури 4°C. Осад суспендували у забуферованому фосфатом сольовому розчині (PBS). Буфер для фарбування клітин (CSB) доводили до 15 мл, центрифугували з прискоренням 350g упродовж 5 хвилин. Осад збирали, до кожної пробірки додавали 3 мл. буферу для лізису і витримували на льоду протягом 5 хвилин.

Для визначення механізму загибелі виділених з молока клітин використовували рекомбінантний білок Анексин V, мічений флуоресцентною міткою EGFP. Він специфічно взаємодіє з фосфатидилсерином та бромідом етидію (EtBr), є флуоресцентним ДНК-інтеркалятором з максимальною довжиною хвилі поглинання 520 нм. і максимальною інтенсивністю флуоресценції 600 нм, яка збільшується в 20 разів при взаємодії з ДНК.

Осад центрифугували з прискоренням 300g протягом 10 хв. Потім додавали 500 мкл середовища 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 10 мкг рекомбінантного анексину V-EGFP і 6 мкг EtBr. Клітинний осад інкубували протягом 15 хв. за кімнатної температури, відтак поміщали його в інкубатор за температури 4°C.

2.7.2 Проведення протокової цитометрії та інтерпретація отриманих унаслідок неї результатів

Зразки аналізували за допомогою протокового цитометра Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з аргоновим лазером (фіксована довжина хвилі збудження – 488 нм) на основі використання таких параметрів: прямого (малого кутового) FS-розсіювання та бічного SS-розсіювання, а також інтенсивності флуоресценції від каналів FL1 (515-535 нм) та FL3 (610-630 нм). Проточна цитометрія була

скоригована для підрахунку до 10 тис. клітин на зразок. Відсоток клітин кожного типу розраховували як його пропорційне відношення до загальної кількості підрахованих клітин.

2.8 Програмне забезпечення

Підбір праймерів відбувався з використанням пакету програм *Vector NTI Advanced 11* (Invitrogen, США). Обробка даних з протокового цитофлуориметра – *FCS Express v3.0*. Для статистичної обробки бактеріологічного дослідження використовувалися програми Microsoft Excel та bioMerieux. Для створення та упорядковування рисунків – Adobe Photoshop CS5 2014. Для оформлення дисертаційної роботи – Microsoft Word згідно з правилами та рекомендаціями, викладеними у наказі Міністерства освіти та науки України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій».

РОЗДІЛ 3.
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
МІКРОБНИЙ ПЕЙЗАЖ СЕКРЕТУ ВИМ'Я КОРІВ ПРИ МАСТИТІ ТА
ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО
АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

3.1 Бактеріологічний моніторинг різних форм маститу корів

Після постановки мети та основних завдань дослідження на початковому етапі експериментальної роботи було проведено аналіз поширеності маститів у господарствах на території України та визначення бактеріальної етіології маститу. У період 2015-2016 р. було проаналізовано 92 зразки молока хворих на запалення молочної залози корів з 20 фермерських господарств України. Високий показник поширеності патології молочної залози ще раз підтверджує доцільність обраної мети роботи та практичну значущість результатів.

У ході бактеріологічних досліджень ми виділили 65 штамів мікроорганізмів із 92 проб молока від корів, хворих на клінічний і субклінічний мастит: 17 штамів *Streptococcus agalactiae* — 26%, 10 штамів *Staphylococcus aureus* — 15 %, 9 штамів група КНШ *Staphylococcus spp.* — 14% та *E. coli* — 11%. від загальної кількості виділених мікроорганізмів

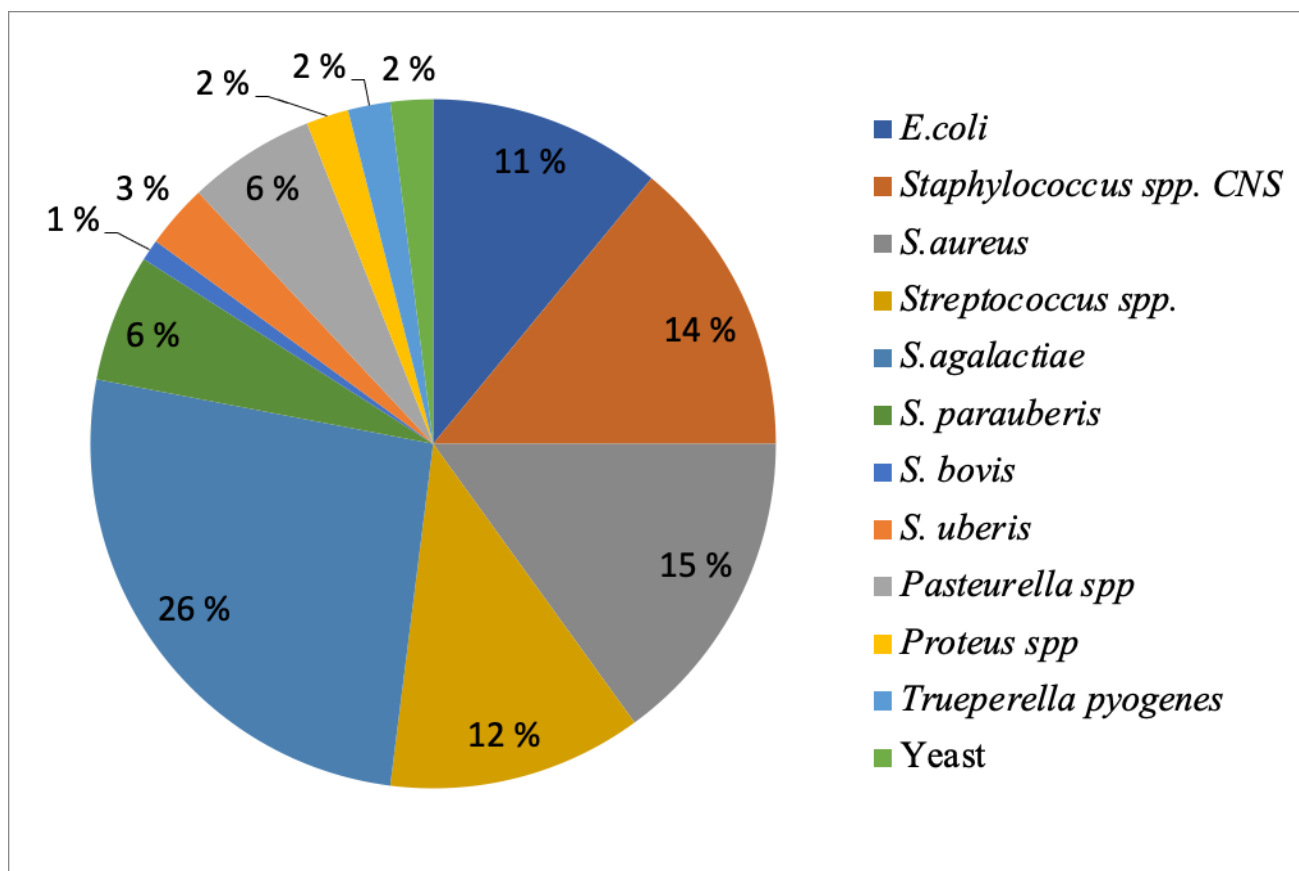


Рис. 3.1 Результати бактеріологічного дослідження проб молока (зразків з ураженої чверті вимені) у корів з клінічною та субклінічною формою маститу

Решту представили *Streptococcus spp.* — 12% (без визначення виду бактерії), *St. parauberis* — 6%, *St. bovis* — 1,5%, *St. uberis* — 3%, *Pasteurella spp* — 1.5 %, *Proteus spp* — 1,5%1,5%, *Arcanobacterium pyogenes* — 1,5% від загальної кількості виділених мікроорганізмів та дріжджі роду *Candida spp.* Таким чином, серед від загальної кількості виділених мікроорганізмів були 41% – контагіозні збудники, 59% – енвіроментальні збудники маститу корів.

Таблиця 3.1.

Розподіл збудників маститу за їхньою чутливістю до антибіотиків
(див.Додаток №2)

Таблиця 3.1.

Розподіл загальної кількості ізолюваних збудників маститу за їхньою чутливістю до антибіотиків

<i>Діюча речовина антибіотика</i>			<i>Кількість ізолятів</i>	<i>чутливих</i>	<i>%*</i>
<i>Амоксицилін</i>	+	<i>клавуланова кислота</i>	58		93,5
<i>Гентаміцин</i>			58		93,5
<i>Рифампіцин</i>			52		83,8
<i>Амоксицилін</i>			50		80,6
<i>Бацитрацин</i>			49		79
<i>Клоксацилін</i>			48		77,4
<i>Триметоприм</i>			46		74,1
<i>Флорфенікол</i>			42		67,7
<i>Ампіцилін</i>			42		67,7
<i>Лінкоміцин</i>			41		66,1
<i>Цефалексин</i>			41		66,1
<i>Енрофлоксацин</i>			38		61,2
<i>Неоміцин</i>			35		56,4
<i>Пеніцилін</i>			34		54,8
<i>Стрептоміцин</i>			30		48,3
<i>Тилозин</i>			13		20,9

Примітка: *% - відсоток чутливих ізолятів стосовно загальної кількості ізолятів (p<0.05 у порівнянні з контрольною групою)

Як видно з даних, наведених у Табл. 3.1 і Табл. 3.2, більшість виділених ізолятів були чутливими до амоксициліну + клавуланової кислоти і гентаміцину – 93,5%. Найменша кількість ізолятів була чутливою до тилозину – 20,9% та

стрептоміцину – 48,3%. Значний відсоток ізолятів був чутливий до рифампіцину, амоксициліну, бацитрацину, клоксациліну, триметоприму, флорфеніколу, ампіциліну, лінкоміцину, цефалексину, енрофлосацину, неоміцину, пеніциліну.

Чутливість ізолятів *E. coli* до антибіотиків дещо відрізняється. Всі 7 ізолятів цього збудника були стійкими до амоксициліну, пеніциліну, тилозину, неоміцину, лінкоміцину, клоксациліну, рифампіцину, бацитрацину та цефалексину. 6 із 7 ізолятів були стійкими до ампіциліну, а 5 із 7 – до стрептоміцину. Всі виділені ізоляти *E. coli* були чутливими до гентаміцину та триметоприму, значний їхній відсоток (86%) – до амоксициліну + клавуланової кислоти та енрофлосацину.

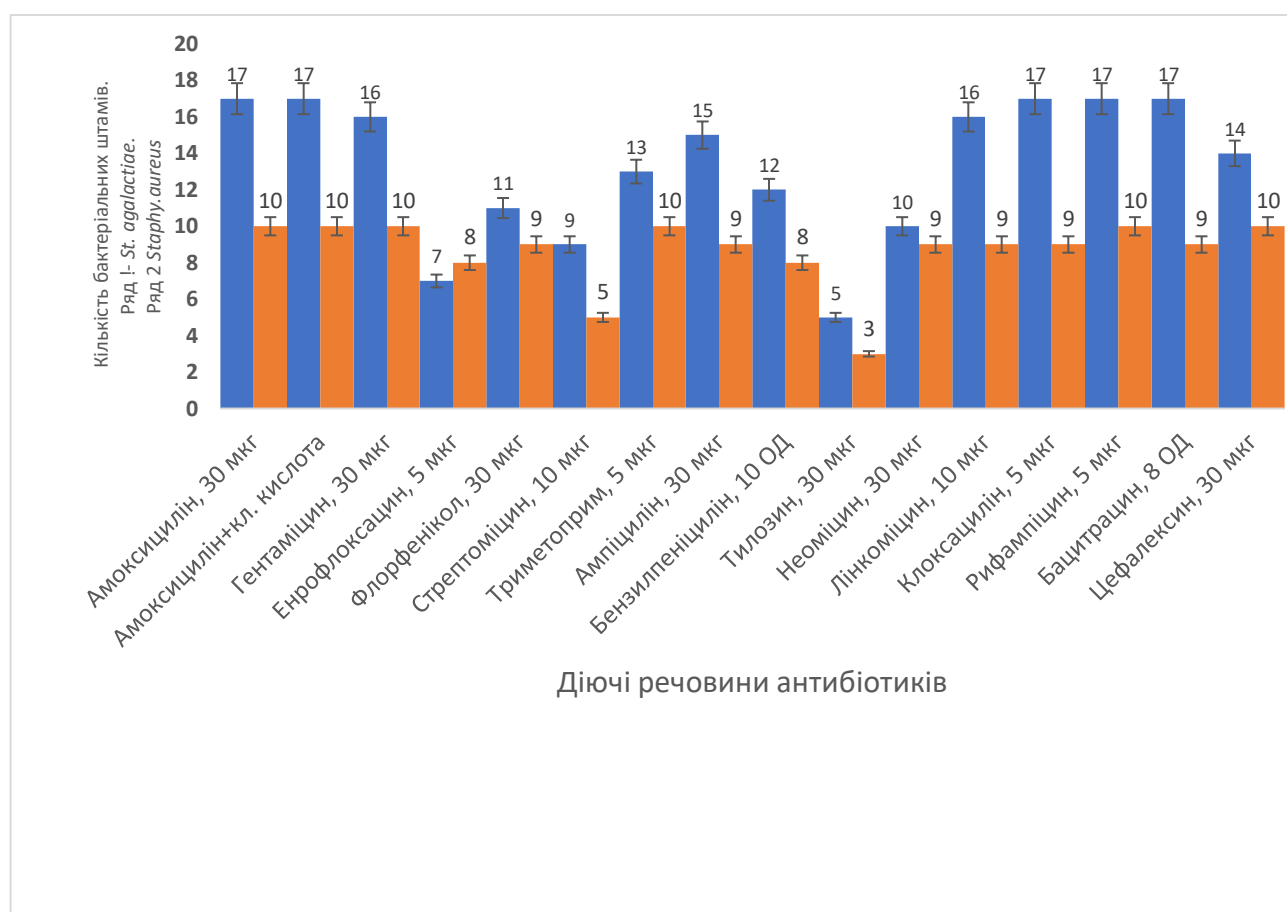


Рис. 3.2. Антибіотична чутливість до контагіозних збудників маститу (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*)

Показана на Рис. 3.2. чутливість до антибіотиків таких контагіозних агентів як *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus agalactiae* була приблизно однаковою. Більшість ізолятів контагіозних збудників були чутливими до амоксициліну, амоксициліну + клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, клоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, цефалексину та триметоприму; стійкими до тилозину та стрептоміцину.

3.2 Дослідження бактерицидного ефекту гігієнічного засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0.3%, повідон йоду 0.5 % та молочної кислоти 0.5 %, виробник ТОВ «Санвет».

Визначали бактерицидну дію дезінфекційного засобу, виготовленого на основі активного йоду 0,3% (3000 рп), повідон йоду 0,2 % (2000 рп), до тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* Проаналізовано 150 бактеріальних культур, які були ізольовані від корів із клінічними та субклінічними формами маститу.

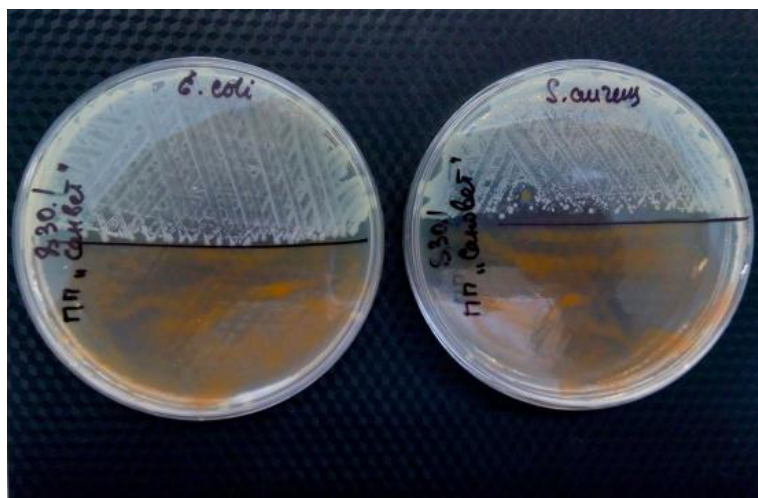


Рис.3.3 Бактеріостатична дія засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0,3%, повідон йоду 0,2 % для обробки шкіри дійок корів після доїння 1. Повне

пригнічення росту *E.coli* (ліворуч нижня половина чашки) 2. *Staphylococcus aureus* (праворуч нижня половина чашки)

Таблиця 3.2

Визначення бактерицидної дії гігієнічного засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0,3%, повідон йоду 0,2 % до збудників маститу корів

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1
тест-штами мікроорганізмів										0
<i>St. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphy.aureus</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
№ п/п	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
тест-штами мікроорганізмів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
<i>St. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Staphy.aureus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
№ п/п	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
тест-штами мікроорганізмів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
<i>St. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Staphy.aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: "+" - наявний ріст мікроорганізмів; "-" - ріст мікроорганізмів відсутній.

Як видно з даних таблиці 3.3, досліджуваний засіб проявляв 100% бактерицидну дію до тест штамів таких як *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, а от до ізолятів *E. coli* – 75%, *Staphy. aureus* – 70%.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

Проведене дослідження різноманітності біологічних ізолятів у зразках молока показало, що штами стрептококів є причиною 48,5% усіх діагностованих випадків маститу. З-поміж грамнегативних збудників, які викликають мастит, більшість становить кишкова паличка (*E. coli*), а втім, на неї припадає усього 11% випадків цього захворювання.

Найефективнішими антибіотиками для боротьби зі збудниками маститу є амоксицилін + клавуланова кислота та гентаміцин. Найменш ефективним антибіотиком є тилозин.

Оскільки бактеріальні штами можуть набувати резистентності до дезінфекційних засобів для гігієнічної обробки дійок, існує потреба в перевірці ефективності їхнього захисту від збудників маститу.

Представлені у цьому розділі результати досліджень опубліковано у власних наукових працях [163] та апробовані на:

11. Mazurenko VR., Mazurenko OV, Chvostenko OG. Bactericidal effect of post-milking teat dip by «Povidon-Protect». II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine. 2016. P.119; **(стендова доповідь)**

12. Mazurenko VR, Sobko IO. Evaluate effectiveness of different antibiotics and prevalence of contagious mastitis pathogens on dairy farms in Ukraine. II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”;2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine.2016. P.114; **(усна доповідь).**

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ МІКОПЛАЗМОВОГО МАСТИТУ У КОРІВ НА ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ ТА КОНТРОЛЬ ПОШИРЕННЯ *Mycoplasma bovis*

4.1 Дослідження *Mycoplasma spp.*

Зразки молока відбирали у корів за клінічними ознаками (молоко було зі згустками і містило «пластівці») після проведення спеціального тесту на наявність соматичних клітин (PortaCheck, США) та лактатдегідрогенази (PortaChek, США).

Таблиця 4.1.

Поширеність *Mycoplasma spp.* у різних областях України
(за результатами аналізу генетичного матеріалу)

Область	Кількість досліджених ферм	Кількість досліджених зразків	Кількість позитивних проб на виявлення <i>Mycoplasma spp.</i>
Полтавська	5	17	4
Харківська	3	16	16
Сумська	1	8	8
Хмельницька	2	11	7
Київська	4	47	9
Вінницька	1	2	2
Миколаївська	1	14	0
Черкаська	3	19	5
Загальна кількість	20	144	61

Було відомо, що досліджувані господарства мали проблеми з мікоплазмозом (до 30% тварин були хворі на вульвовагініт).

Аналіз 144 проб молока, отриманих із 20 молочних ферм, показав наявність ДНК збудника у 61 зразку.

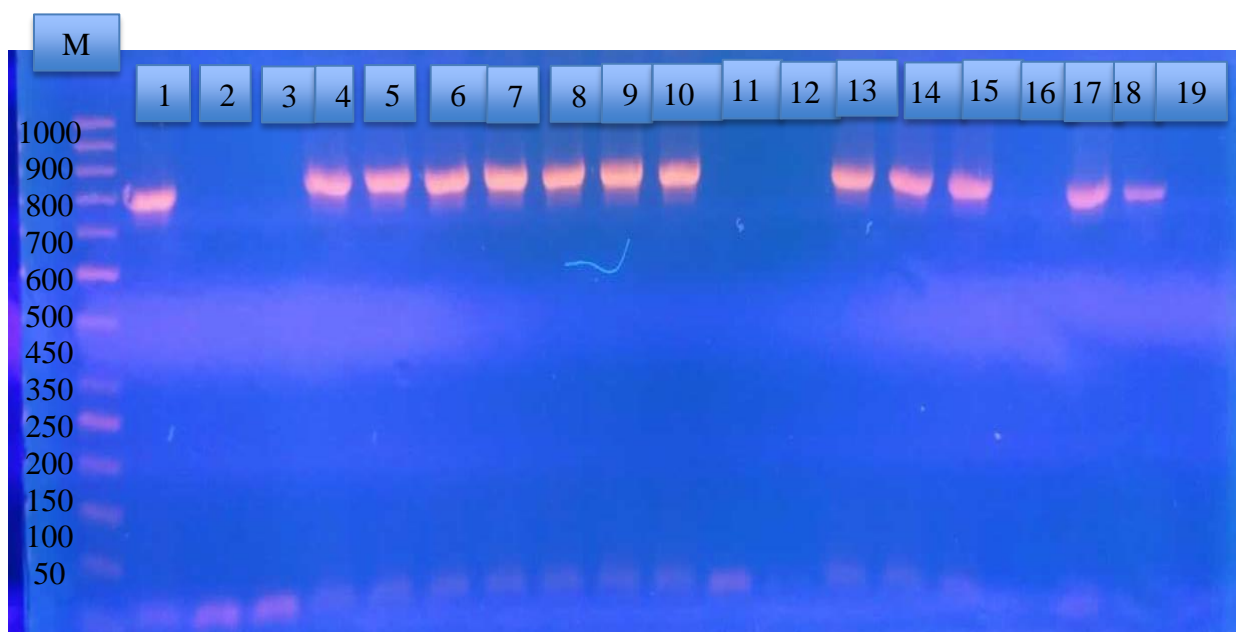


Рис.4.1 Електрофореграма продуктів ПЛР: **М** – маркер молекулярних мас, 1 – позитивний контроль, 2 – негативний контроль, 4-10,13-15,17-18 – позитивні зразки на *Mycoplasma spp.* 3,11-12,16,19 – негативні зразки на *Mycoplasma spp.*

4.1.1 Дослідження *Mycoplasma bovis*

Позитивні зразки об'єднували у збірні зразки відповідно до назви господарства, але не більше 5 одиниць на зразок. Аналіз цих зразків на наявність

ДНК *Mycoplasma bovis* виявив ДНК збудника у 10 зразках, отриманих із 15 господарств.

Відтак позитивні зразки були проаналізовані з метою кількісного визначення вмісту ДНК збудника за допомогою ПЛР в режимі реального часу. Результати цього аналізу представлені в Таблицях 4.1 і 4.2.

Таблиця 4.2

Результати кількісного визначення генетичного матеріалу *Mycoplasma bovis* у досліджуваному коров'ячому молоці з використанням ПЛР в режимі реального часу (значення Ct)

Область	Кількість досліджених ферм	Кількість досліджених зразків	Кількісне визначення <i>M. bovis</i>
Полтавська	1	2	Ct* = 36,98
Харківська	3	5	Ct = 24,97
Сумська	1	2	0
Хмельницька	2	3	0
Київська	4	5	Ct = 37,97 Ct = 24,97 Ct = 28,97 Ct = 34,17 Ct = 22,33
Вінницька	1	2	0
Миколаївська	3	3	Ct = 37,97 Ct = 25,85

Ct = 32,20

Загальна кількість	15	20	10 (позитивних)
-----------------------	----	----	-----------------

Примітка: *Значення «Ct» є відносним показником кількості шуканого в зразку генетичного матеріалу і виражається в циклах від 1 до 35: що вищий цикл, то меншою є первинна кількість матеріалу в зразку і навпаки.

Ct = 16-24 – «+++»;

Ct = 25-31 – «++»;

Ct = 32-37 – «+»;

Ct ≥ 38-40 «+ \-».

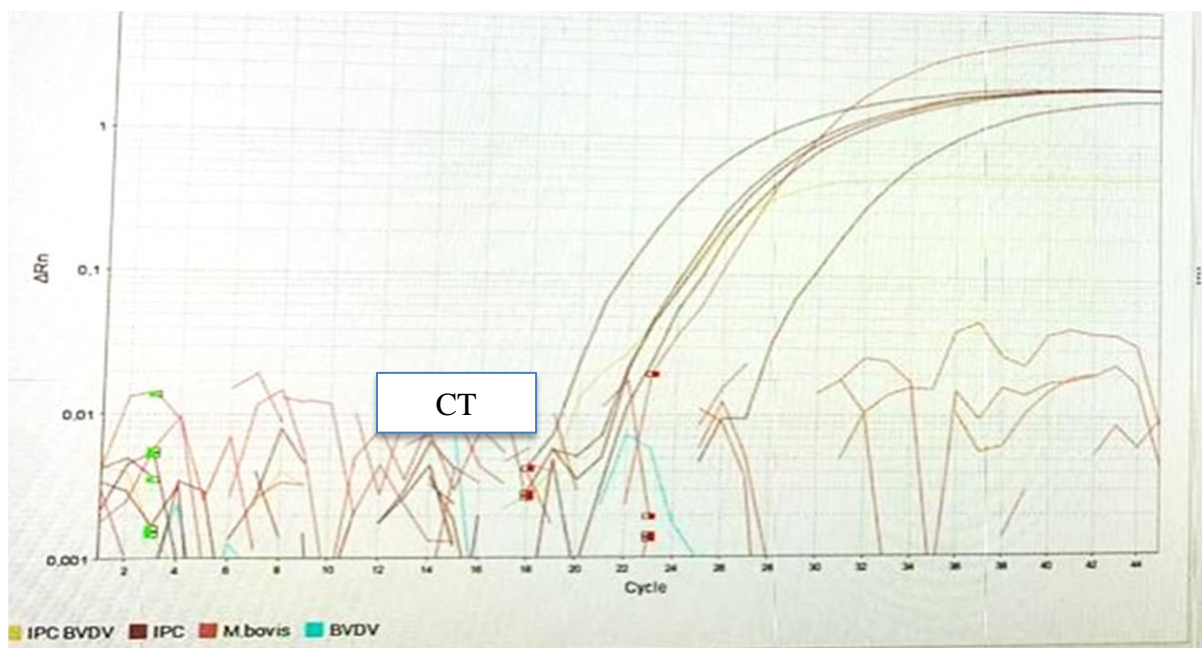


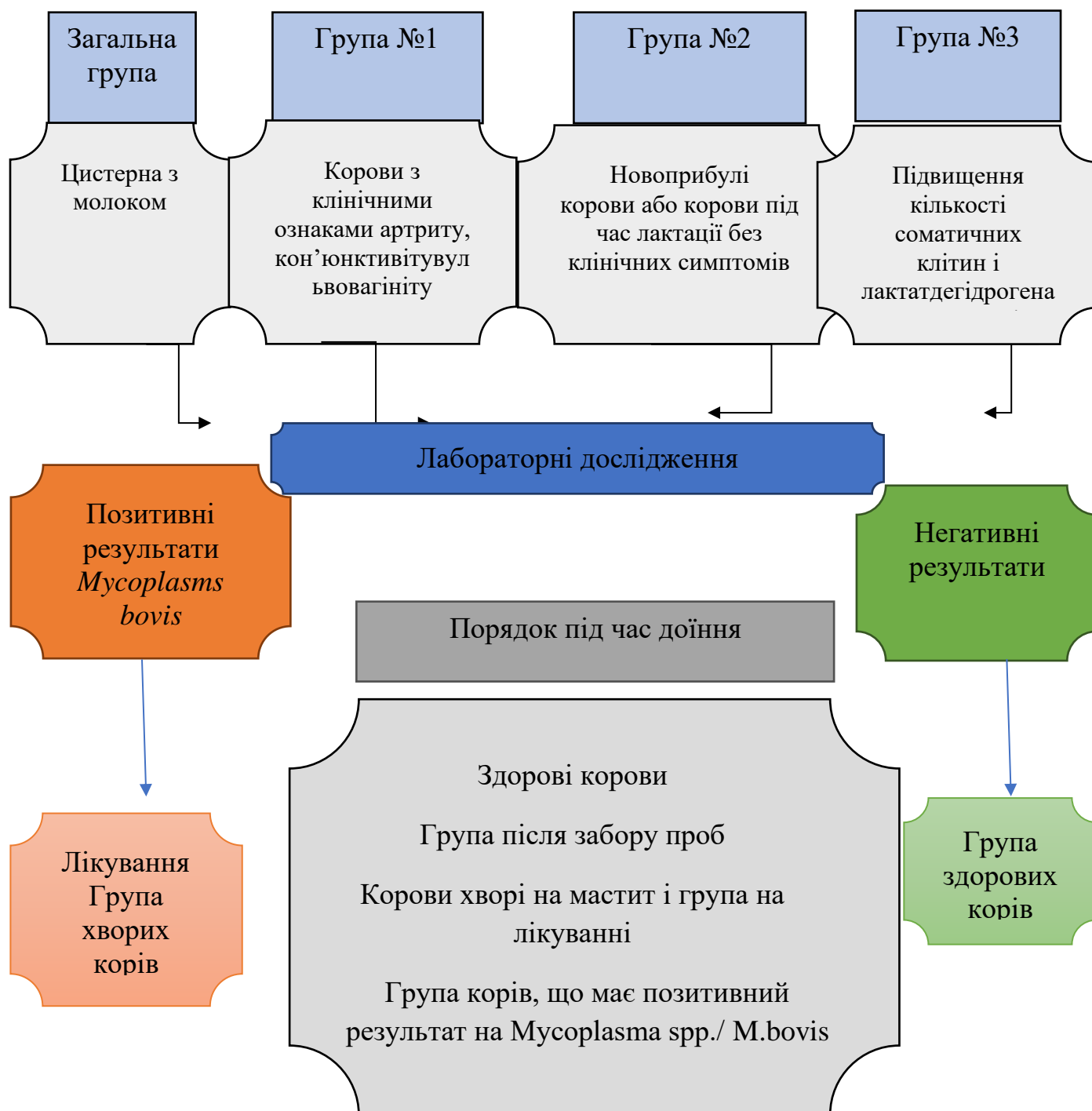
Рис. 4.2. Результати ПЛР в реальному часі: криві ампліфікації.

Базуючись на проведеному аналізі, запропоновано алгоритм визначення інфекційного стану *Mycoplasma bovis* та відбору проб для його діагностики, а також порядок доїння корів (див. Рис.4.3).

Для контролю інфікованого стану стада корів на *Mycoplasma bovis* необхідно регулярно брати проби молока для ПЛР-аналізу із загальної цистерни з молоком, а також брати проби у кожної корови з підвищенням кількості соматичних клітин і лактатдегідрогенази в секреті молочної залози (Група № 3).

Крім того, слід брати проби у всіх корів, що були переведені до дійного стада, відразу після отелення або під час лактації (Група № 2).

З метою запобігання передачі мікоплазми через доїльний апарат, новопридбаних корів та телят необхідно помістити на карантин для перевірки на *Mycoplasma bovis* перед приєднанням до стада. Корів з клінічними ознаками інфекції (артрит, кон'юнктивіт, вульвовагініт) слід перевірити на наявність *Mycoplasma bovis*, а після підтвердження зараження – помістити у відповідну доїльну групу (Група № 1). Алгоритм визначення статусу інфекції на контагіозні збудники та відбору проб для діагностики і порядок процедури доїння.



Корів із позитивним результатом на *Mycoplasma bovis* слід доїти після здорових корів та після корів з маститом іншої етіології. У стадах із негативним результатом, до яких регулярно долучають велику рогату худобу, потрібно двічі на місяць перевіряти молоко з цистерни на мікоплазму.

Отже, результати вивчення патологічного молока на наявність *Mycoplasma spp.* і ДНК *Mycoplasma bovis* показали, що більшість корів із ідентифікованим генетичним матеріалом збудника в молоці також мали проблеми з інфекційними захворюваннями репродуктивного та респіраторного тракту. Отримані дані дозволяють планувати комплекс профілактичних та лікувальних заходів у господарствах для запобігання зараженню здорових тварин.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

Унаслідок проведених досліджень наявність *Mycoplasma spp.* було виявлено у 63 зразках з усіх проб молока. Оскільки деякі види мікоплазм є комменсалами слизових оболонок та шкіри корів рекомендовано визначати вид збудників, які актуальні при даній патології захворювання. Результати досліджень літературних джерел стверджують, що для корів актуальним патогенним збудником який викликає захворювання репродуктивного тракту є *Mycoplasma bovis*.

Таким чином *Mycoplasma bovis* були виявлені у 10 зразках молока. Спираючись на отримані результати, було запропоновано алгоритм відбору проб для проведення молекулярної діагностики маститу етіології *Mycoplasma bovis*, а також послідовність доїння корів у несприятливих господарствах для запобігання поширенню захворювання. Результат може бути застосований для плану боротьби із маститом на фермі.

Виявлення заражених корів, профілактичні заходи у доїльній залі та в приміщеннях з новоприбулими коровами та дотримання порядку доїння – це основні методи профілактики спалахів мікоплазмозу. Кожна ферма у певний період має проблему із захворюваннями молочної залози у корів і кількість інфекцій може збільшуватися, якщо патогенні мікроорганізми пов'язані з маститом, не будуть вчасно виявлені.

Результати, представлені у даному розділі, у власних наукових працях

1. Mazurenko VR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017;3(3):26–29

РОЗДІЛ 5.

ВИЗНАЧЕННЯ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ТА ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЯК ДОПОМІЖНИХ БІОМАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ СУБКЛІНІЧНОГО МАСТИТУ В МОЛОЧНІЙ ЗАЛОЗІ КОРІВ

5.1 Визначення активності ферменту лактатдегідрогенази та соматичних клітин

Отримані дані показали, що 2 з 20 проб молока мали низькі значення активності ЛДГ, збільшене число СК (250 тис. клітин/мл) та негативні результати бактеріологічних тестів, що може свідчити про відсутність внутрішньої інфекції вимені та фізіологічне збільшення кількості СК у секреті. При підвищеній активності ЛДГ та підвищеній концентрації СК, що не перевищує 250 тис. клітин/мл, виділялися бактерії *Streptococcus agalactiae* або *Staphylococcus aureus*, що свідчить про моноінфекцію. При рівні СК від 250 тис. клітин/мл до 500 тис. клітин/мл (4 з 20 зразків молока) виділялися бактерії *Streptococcus agalactiae* та *Staphylococcus aureus*, що свідчить про мікс-інфекції.

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що активність ферментів пов'язана зі збільшенням кількості СК в секреті молочної залози.

Отже, контроль на активність ферменту ЛДГ дозволяють точніше визначити наявність запальних процесів у вимені, оскільки кількість СК також може зростати через фізіологічні зміни (вік, лактація, стрес і т. ін.).

На основі проведених досліджень пропонується такий алгоритм виявлення контагіозного субклінічного маститу: каліфорнійський тест, подальший аналіз умовно позитивних зразків (+/-) на активність ЛДГ і кількість СК у молоці та, за необхідності, бактеріологічні дослідження (див додаток №4,5,6).

Отже, контроль основних маркерів інфекційного процесу (рівень активності ЛДГ та наявність соматичних клітин у молоці) дозволяє більш точно визначити субклінічний мастит в інфікованому стадії. Аналіз необхідний для виявлення груп ризику та покращення моніторингу якості молока, а також для контролю ефективності профілактичних заходів (вакцинація, лікування вимені спеціальними препаратами до та після доїння тощо).

Таблиця 5.1.

Результати виявлення біомаркерів інфекції та проведення мікробіологічного дослідження секреції молочної залози у дійних корів

№	ЛДГ (од/л)	СК (в 1 мл)	Бактеріологічний посів
1	< 100	< 100 000	Негативний
2	200-500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
3	100-200	250 000	Негативний
4	< 100	< 100 000	Негативний
5	200-500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
6	200-500	250 000	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	< 100	< 100 000	Негативний
8	200-500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
9	< 100	< 100 000	Негативний
10	< 100	< 100 000	Негативний
11	< 100	250 000	Негативний
12	100-200	250 000	<i>Staphylococcus aureus</i>
13	200-500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
14	200-500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ;

			<i>Staphylococcus aureus</i>
15	500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
16	500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
17	< 100	250 000	Негативний
18	200-500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
19	< 100	< 100 000	Негативний
20	200-500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
21	< 100	< 100 000	Негативний
22	> 500	1 000 000	Позитивний

Примітка: *P<0,05 у порівнянні з негативним контролем; #P<0,05 у порівнянні з позитивним контролем

5.2 Аналіз осаду клітин молока за допомогою протокової цитометрії для ідентифікації субклінічної інфекції

Відомо, що збільшення кількості соматичних клітин у молоці корів є наслідком запальних процесів вимені. Дослідження показали, що кількість соматичних клітин у молоці <200 тис. клітин/мл вважається показником здорового стану вимені[164]. Подібні зміни ми констатували при визначенні кількості соматичних клітин методом мікроскопії.

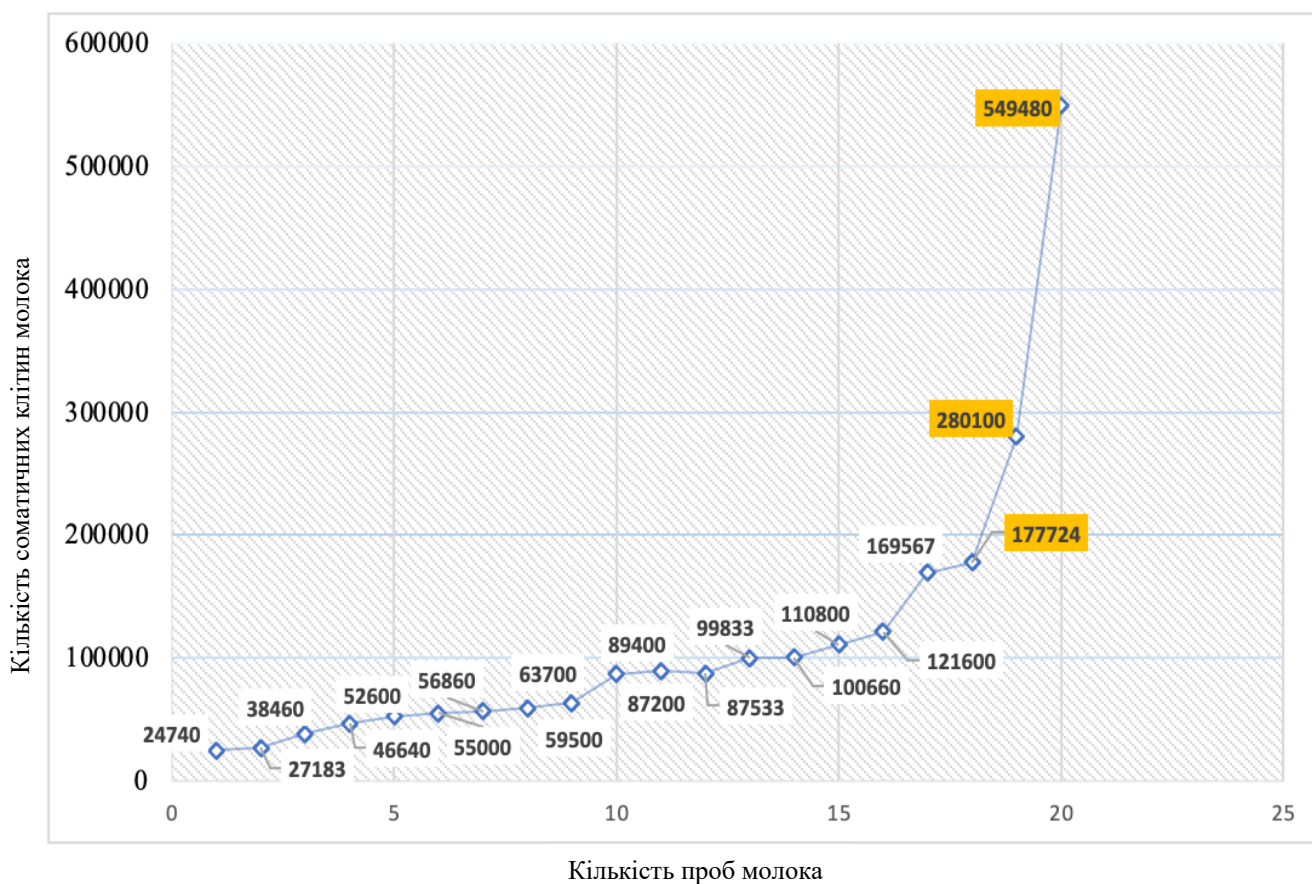
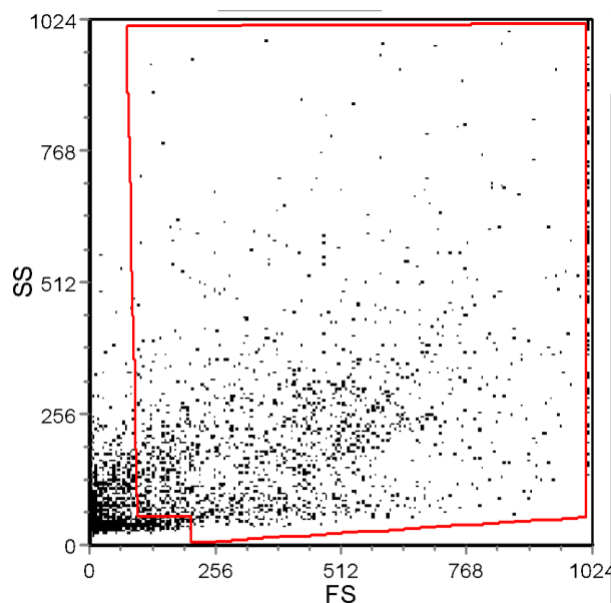


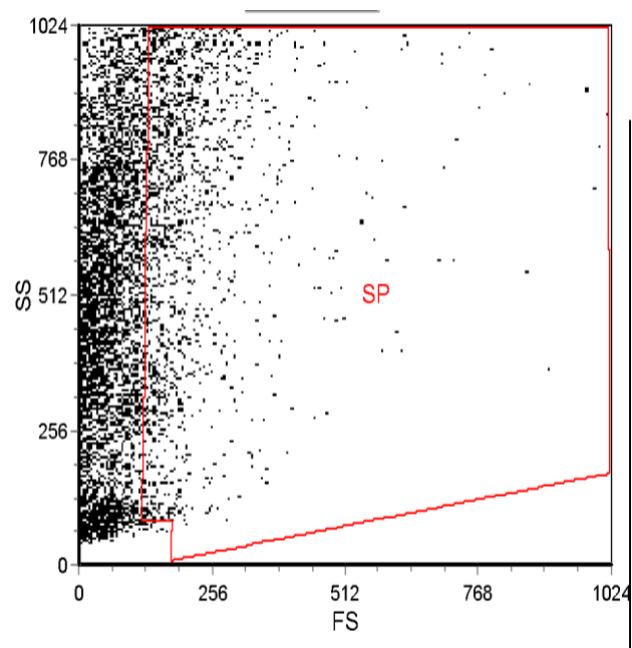
Рис.5.1 Результати підрахунку соматичних клітин в осаді молока

Мікроскопічне дослідження зразків осаду клітин молока від 20 корів показало, що соматичні клітини представлені в них у різних кількостях – від 24740 до 5494800 в 1 мл. У зразках молока виявлено бактерії *Streptococcus agalactiae* (3 з 20 проб) та золотистий стафілокок (1 з 20 проб), що підтверджує субклінічну інфекцію вимені корів.

A1



A2

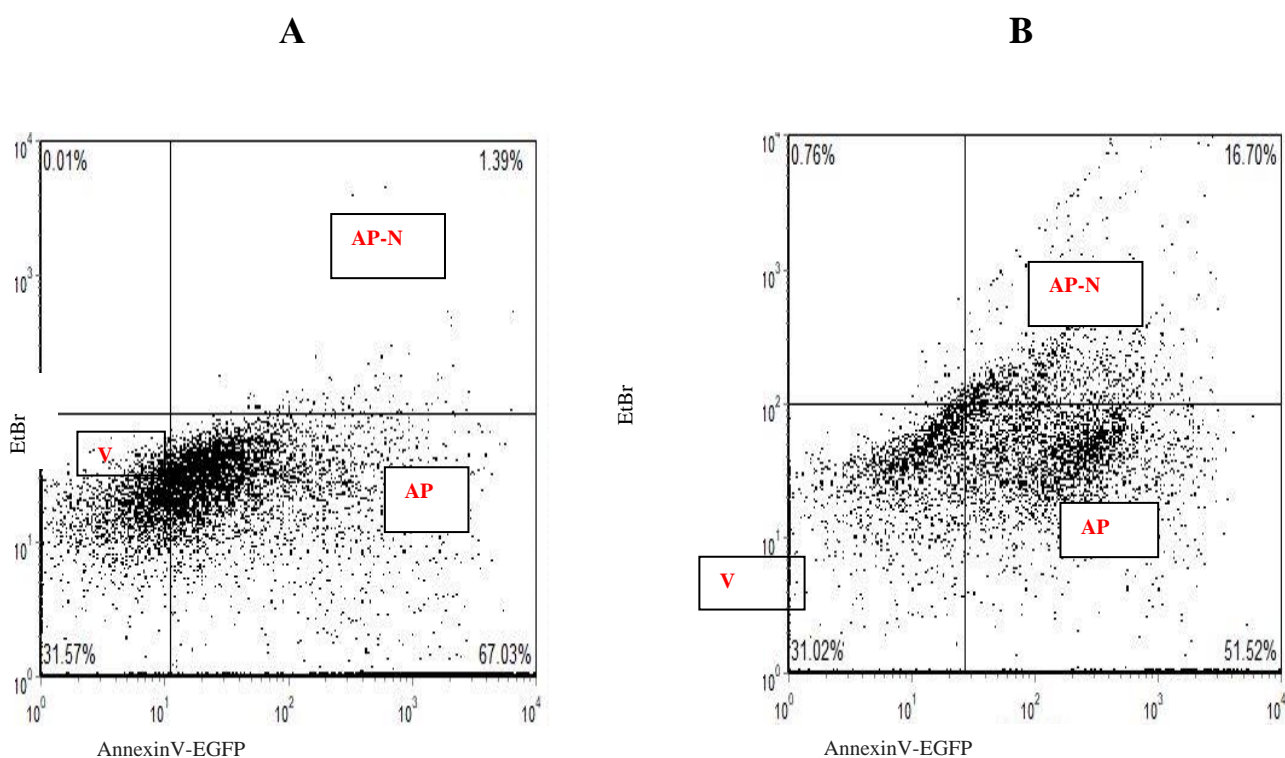


SP* – стандартні популяційні клітини, які аналізували за допомогою протокової цитометрії, щоб виключити дебріс

Рис. 5.2. Характеристика зразків молока, відібраних у корів із субклінічним маститом та корів без маститу. Протокова цитометрія осаду клітин із молока, виділених від корів (A1) з низьким вмістом соматичних клітин (100660 клітин / мл) та з високим рівнем соматичних клітин (5494800 клітин / мл) (A2). Точковий графік SS проти FS.

Популяції клітин, присутні в молоці, змінюються під час розвитку маститу [171]. Неоднорідна популяція клітин також може бути присутня у корів із субклінічним перебігом маститу. Молоко від корів із маститом містило додаткові популяції клітин, що супроводжують запалення (нейтрофіли), які можна виявити за діаграмою розподілу клітин за сигналами з фронтальним (FS) та бічним (SS) розсіюванням світла (рис. 1).

Зміни плазматичної мембрани соматичних молочних клітин є однією з найбільш ранніх характеристик розвитку апоптозу, виявленого в живих клітинах. Зазвичай зовнішній і внутрішній шари мембрани суттєво відрізняються за своїм ліпідним складом, зокрема, фосфатидилсерин відсутній у зовнішньому шарі живих клітин мембрани [172].



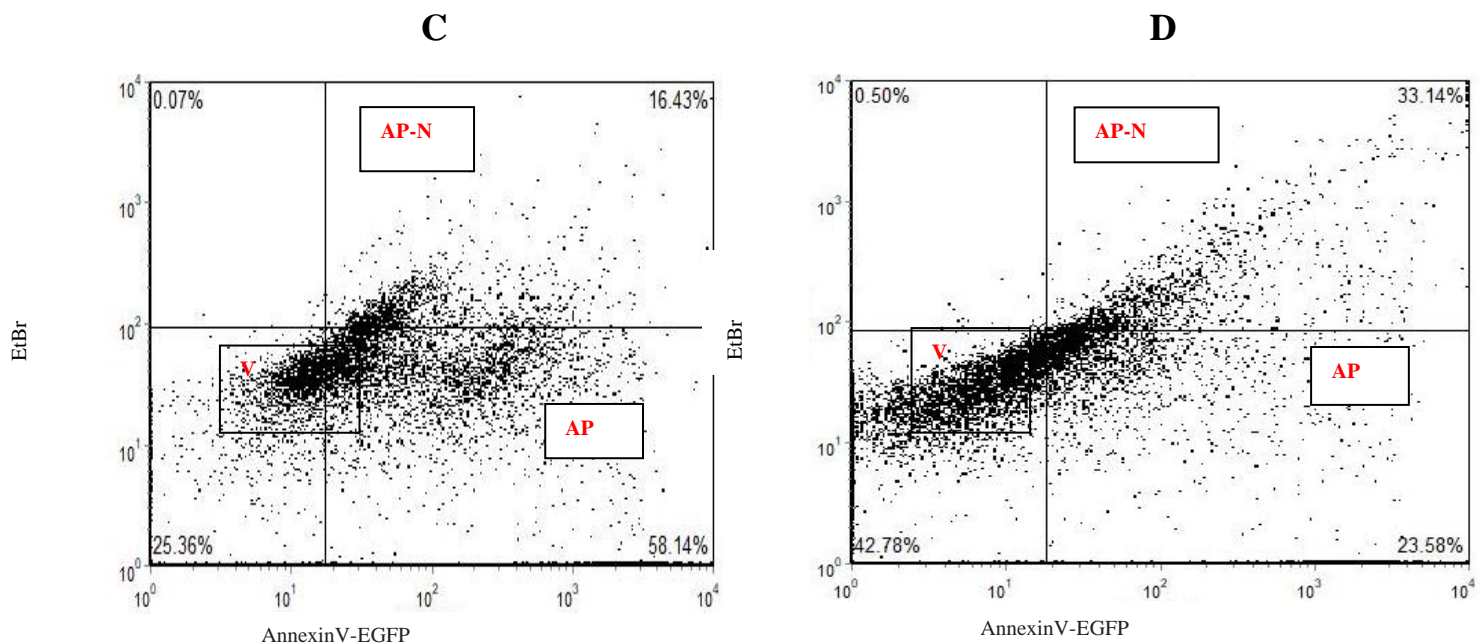


Рис.5.3. Графіки типового експерименту для визначення апоптозу та некрозу клітин із субклінічним маститом корів, де представлені **V**-живі клітини (EGFP- / EtBr -), **AP**-клітини (EGFP + / EtBr -) **AP-N** EGFP- / EtBr +)-пізній апоптоз, початок некрозу. **A**-Зразок молока з міксінфекцією, **B**-Зразок молоко з моноінфікуванням 1, **C**-Зразок молоко з моноінфікуванням, **D**-Негативний зразок

Екстерналізація фосфатидилсерину необхідна для клітин молочної залози, оскільки це своєрідний сигнал для макрофагів у секреті молочної залози, що беруть участь в поглинанні апоптотичних тіл [172]. Наявність фосфатидилсерину у зовнішній мембрані апоптотичних клітин дозволяє Анексину V-EGFP підраховувати кількість клітин за допомогою цитометрії

(рис.5.3). Показано, що при низькому вмісті клітин у молоці вони переважно гинуть внаслідок апоптозу.

Некротичні клітини СКМ у корови без маститу складала 24% у порівнянні з 67% у корів із маститом. Кількість апоптичних SCC у корови без маститу складала 33% проти 12% у корів з маститом (рис. 5.3). Можна зробити висновок, що апоптоз тісно пов'язаний з функціональністю нейтрофілів та макрофагів [171,172] і відіграє ключову роль у захисті від вторгнення патогенів та фізіології запальної реакції [165,167]

Наші дослідження дозволяють припустити, що життєздатність соматичних клітин варіюється [167,170] і залежить від статусу інфекції , часу початку інфікування [168] та лактації [169].

Можна зробити висновок, що цей метод пропонує можливість протокової цитометричної ідентифікації та кількісної оцінки життєздатних, апоптичних та некротичних соматичних клітин молока для виявлення прихованого маститу у корів. Але необхідні подальші дослідження для визначення нейтрофілів та моноцитів при інфекціях в молочній залозі, оскільки ця інформація може виявитися корисною, особливо для оцінки корів у пізній лактації та відразу після отелу, коли нейтрофіли можуть бути підвищені фізіологічно.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

Отже, визначення активності лактатдегідрогенази дозволяє більш точно визначити наявність запальних процесів у вимені, оскільки кількість соматичних клітин може підвищуватись і в разі фізіологічних змін (наприклад, стресу і т. ін.). Отримані результати можуть бути застосовані для визначення субклінічних форм маститу в інфікованому стаді. Рекомендації, розроблені на підставі цього дослідження, були реалізовані на практиці у господарстві Чернігівської області.

Апоптоз та некроз соматичних клітин дозволяють краще оцінити стан імунного гомеостазу, що слід враховувати під час діагностики захворювань. Визначення кількості подій клітин за допомогою протокової цитометрії в молочній залозі корів дозволяє більш об'єктивно оцінити стан місцевого імунітету вимені в нормі та у разі патології. Популяції клітин, присутні в молоці, змінюються під час розвитку запалення та маститу. Неоднорідна популяція клітин також може бути присутньою у корів із субклінічним перебігом маститу. Протокова цитометрія скринінгу молока може слугувати діагностичним та прогностичним критерієм у щомісячних дослідженнях усіх корів молочного стада для діагностики запалення та прогнозування розвитку субклінічного маститу. Правильний моніторинг клітин може зменшити відсоток клінічних спалахів маститу та допомогти уникнути вибракування молока та корів.

Результати, представлені у цьому розділі, опубліковано у власних наукових працях [162] та пройшли апробацію на:

1. Mazurenko VR., Manchulyak OV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. *Biotechnologia Acta*.2017;10(4):53-54.
2. Mazurenko VR, Sobko IO, Molozhava OS, Kolybo DV. Milk analysis by flow cytometry to identify subclinical mastitis. *Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект*; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна 2020. с.11-14.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Однією із проблем у сучасному молочному скотарстві є раннє виявлення, профілактика та лікування маститів у корів. Мастит корів – широко розповсюджене інфекційне захворювання молочної залози. Низька ефективність методів контролю цієї хвороби пов'язана насамперед із недостатнім розумінням механізмів її патогенезу. Сьогодні необхідно вдосконалювати методи діагностики маститу в корів, який є серйозною проблемою для сільського господарства як в Україні, так і у багатьох країнах світу. Інфекції, викликані *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* не тільки шкодять тваринництву і харчовій промисловості, але також є небезпечними для здоров'я людей – останніми роками ці вказані мікроорганізми дедалі частіше виявляють у людей, зокрема, у пацієнтів з різними імунodefіцитами, вагітних жінок та новонароджених. Ситуацію ускладнює відсутність простих та доступних рекомендацій із діагностування захворювання маститу у ВРХ. Це значно утруднює моніторинг бактеріальних ізолятів та можливість своєчасного вживання заходів запобігання їхньому розповсюдженню. Вивчення первинних маркерів запалення молочної залози є вкрай важливим для розуміння перебігу захворювання та створення засобів для його профілактики і лікування. Відомо, що кількість макрофагів у організмі корів без маститу вища за їхню кількість у організмі корів із маститом. Зазвичай фагоцитоз бактерій макрофагами призводить до їхнього лізису, однак, деякі патогенні бактерії можуть виживати всередині фагоцитів. Відомо, що нейтрофіли переважають у тварин з ознаками маститу.

Щороку українським господарствам завдаються великі економічні збитки, зумовлені запаленням молочної залози корів. Прихований або субклінічний мастит може призводити до маститу клінічно вираженого, за якого молоко стає

зовсім непридатним до вживання. На практиці розпізнавання субклінічних змін, які є початковою стадією інфекції, полягає насамперед у визначенні кількості соматичних клітин у молоці, але цього недостатньо, бо відомо, що СК можуть підвищуватись внаслідок фізіологічних змін. Тому є сенс проводити додаткові дослідження.

Для покращення якості молока рекомендовано своєчасно виявляти субклінічний мастит та встановлювати його етіологію, що допоможе вжити належних лікувально-профілактичних заходів. Для діагностики субклінічного контагіозного маститу згідно з методичними рекомендаціями використовують різні методи дослідження СК: реакція секрету з розчином мастидину, димастину, визначення рН секрету та його електричної провідності, проба відстоювання, підрахунок соматичних клітин (за умовною в'язкістю, вимірюваною за часом витікання контрольованої проби через капіляр), визначення лактози, хлоридів, лізоциму, каталази, лактоферину, бактеріологічні дослідження та ін. [141]. Усі запропоновані методи мають як сильні, так і слабкі сторони. При субклінічному маститі недоліком є те, що кількість соматичних клітин, колір та консистенція секрету вимені є у більшості випадків однаковими як у здорових корів, так і в корів з прихованим маститом, що ускладнює діагностику. Щодо найбільш перевірених методів контролю субклінічного контагіозного маститу вчені мають різні погляди. Одні вважають, що оптимальним методом є реакція з поверхнево-активними речовинами, другі рекомендують встановлювати діагноз за візуальною оцінкою стану вимені та якості молока, визначенням вмісту лактоферину та антитрипсину.

Проведені дослідження експериментальне дослідження, ми встановили, що при низьких значеннях СК (177724 клітин в 1 мл. молока) можливо спостерігати субклінічне інфікування молочної залози корів. Крім цього, з'ясували, що при низьких значеннях СК доцільно використовувати тест на лактатдегідрогеназу.

Отже, розробка комплексної діагностики контагіозних маститів великої рогатої худоби є перспективним напрямом у біотехнології та профілактиці розповсюдження патогенних збудників, тому ми пропонуємо удосконалений алгоритм комплексної діагностики контагіозного маститу ВРХ.

1. Для перевірки корів на предмет інфікування контагіозними збудниками на рівні стада необхідно один раз на місяць регулярно відбирати проби молока для ПЛР-аналізу та бактеріологічного дослідження із загальної цистерни (танкера) з молоком (Схема № 1);

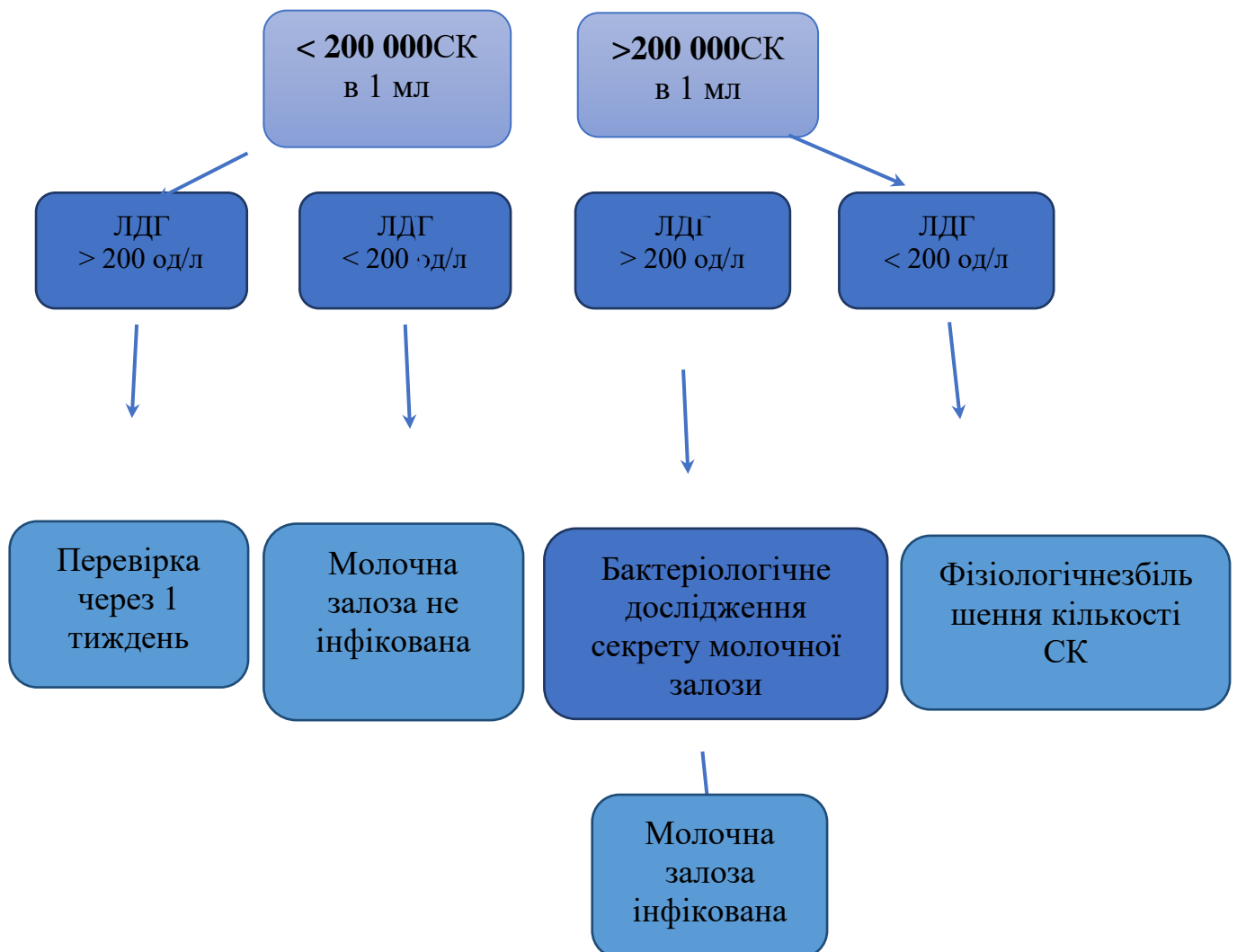


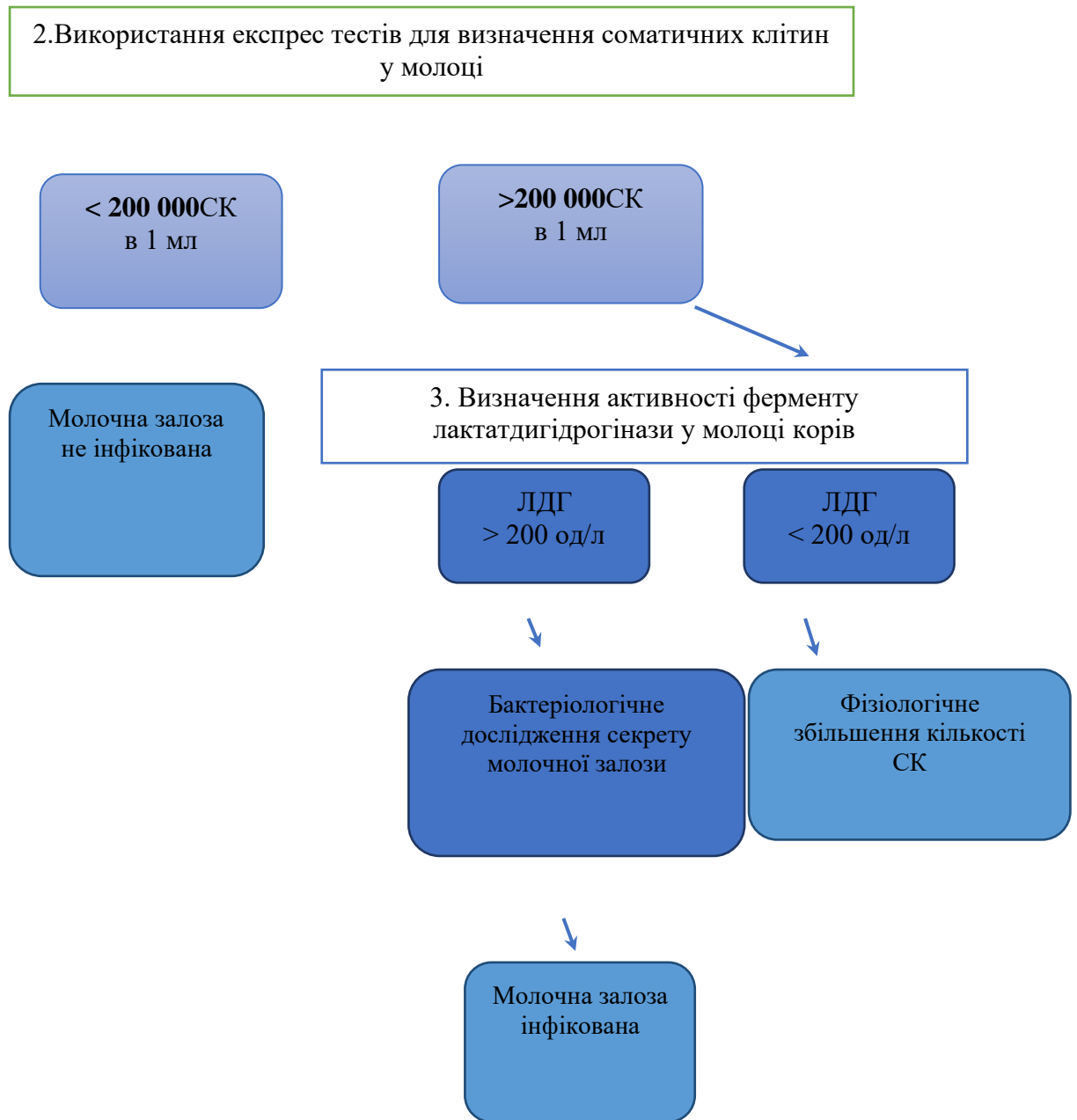
Рис. Алгоритм аналізу молока для виявлення субклінічного маститу.

СК – кількість соматичних клітин у зразку молока з однієї частки молочної залози.

ЛДГ – активність лактатдегідрогенази, вимірювана в секретії молока, взятого з однієї частки молочної залози

2. Для перевірки корів на рівні групи слід використовувати комплексний біотехнологічний алгоритм відбору проб для мікробіологічної діагностики маститу корів, який полягає у застосуванні комплексу методів дослідження, що ґрунтуються на визначенні клінічних ознак захворювання (органолептичні зміни та рН молока), використанні експрес тестів для визначення лактатдегідрогенази в сирому молоці та паралельному визначенні соматичних клітин, що допомагає встановити характер розвитку запального процесу (Схема № 1 та 2);





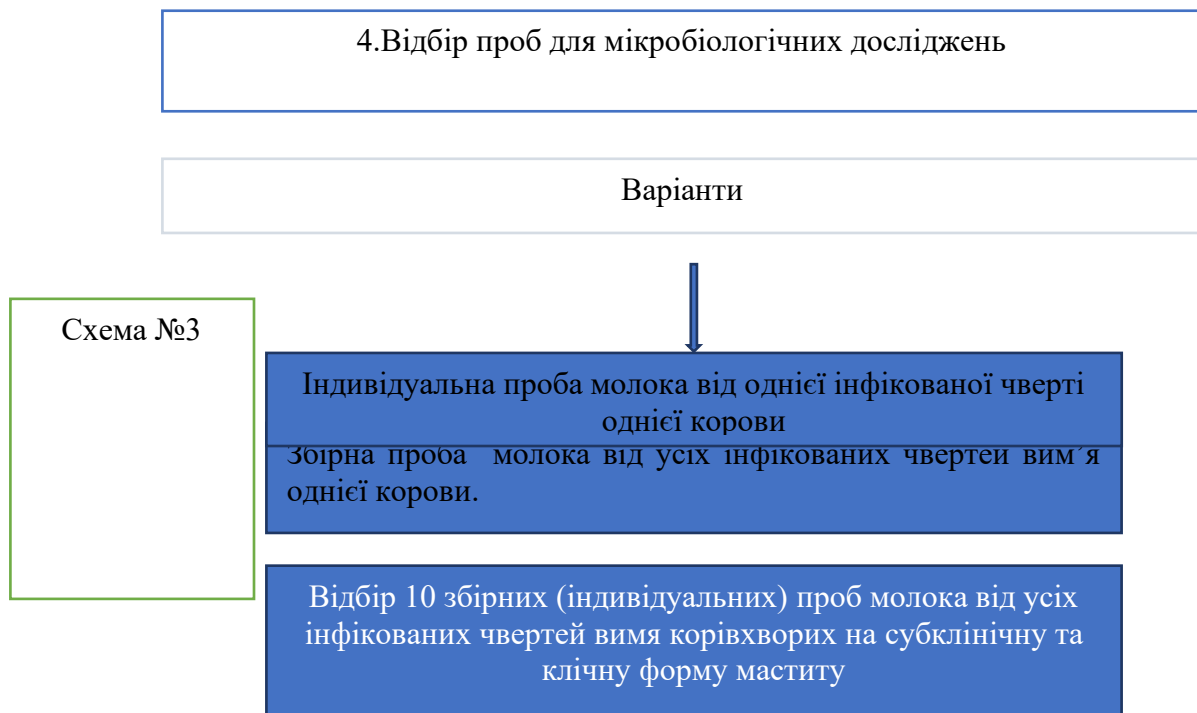
3. Для мікробіологічної діагностики пропонуємо різні підходи.

Підхід 1. Для встановлення циркуляції контагіозних бактеріальних збудників маститу рекомендуємо відбирати мінімум 10 індивідуальних проб молока від корів, хворих на субклінічну та клінічну форми маститу.

Підхід 2. Індивідуальні проби:

- а) відбір збірної проби молока від інфікованих чвертей вимені корови;
- б) відбір проби від однієї інфікованої чверті вимені корови.

(Схема № 3);



4. Слід відбирати проби молока у корів після отелення; Корів із клінічними ознаками артрити, кон'юнктивіту, вульвовагініту, новопридбаних корів та телиць перед приєднанням до стада необхідно помістити на карантин для здійснення тестування на наявність в їхньому організмі збудників маститу

(Схема № 4);

5. Усі тварини з позитивним результатом на контагіозні збудники мають утримуватися окремо від здорових тварин. Таких корів слід лікувати антибіотиками, до яких бактерії проявляють чутливість та доїти їх після здорових тварин.

ДОСЛІДЖЕННЯ НА РІВНІ ГРУП КОРІВ

Група №1

Група №2

Група №3

Корови з клінічними
ознаками артриту,
кон'юнктивіту,
вульвовагініту

Новоприбулі
корови

Корови після отелення

Позитивні
результати

Мікробіологічні дослідження

Негативні
результати

Група хворих
корів

Порядок під час доїння

Група здорових
корів

Здорові корови

Новотільні

Група після забору проб

Група корів, що має позитивний
результат на контагіозні збудники

Група на лікуванні

У дисертаційній роботі, на підставі проведеного комплексу наукових досліджень удосконалено алгоритм діагностики контагіозного маститу корів.

Досліджено бактеріальні збудники, що дозволить оперативно оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження належної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність застосованих профілактичних засобів для запобігання розповсюдженню збудників на фермах.

У ході бактеріологічних досліджень ми виділили 65 штамів мікроорганізмів із 92 проб молока від корів, хворих на клінічний і субклінічний мастит: 17 штамів *Streptococcus agalactiae* — 26%, 10 штамів *Staphylococcus aureus* — 15 %, 9 штамів група КНШ *Staphylococcus spp.* — 14%14% та *E. coli* — 11%. від загальної кількості виділених мікроорганізмів Решту представили *Streptococcus spp.* — 12% (без визначення виду бактерії), *St. parauberis* — 6%, *St. bovis* — 1,5%1,5%, *St. uberis* — 3%, *Pasteurella spp* — 1.5 1.5 %, *Proteus spp* — 1,5%1,5%, *Arcanobacterium pyogenes* — 1,5%1,5% від загальної кількості виділених мікроорганізмів та дріжджі роду *Candida spp.* Таким чином, серед від загальної кількості виділених мікроорганізмів були 41% – контагіозні збудники, 59% – енвіроментальні збудники маститу корів.

Основними засобами для лікування хворих корів на запалення молочної залози залишаються препарати на основі антибіотиків. У нашій країні застосовують в основному антибіотики, без урахування мінімальної інгібуючої концентрації. За кордоном основним напрямком у боротьбі з маститом є використання препаратів на основі вискоєфективних антибіотиків нових поколінь (наприклад, цефалоспоринів), до яких у збудників маститу ще не виробилася стійкість та урахування мінімальної інгібуючої концентрації [173]. Нами проведений дослід аналізу антибіотикочутливості та встановлено, що більшість ізолятів є чутливими до амоксициліну + клавуланової кислоти та гентаміцину – 93,5%. Найменша кількість ізолятів чутливою до тилозину – 20,9% та стрептоміцину – 48,3%. Значний відсоток отриманих ізолятів чутливий до рифампіцину, амоксициліну, бацитрацину, флоксациліну, триметоприму,

флорфеніколу, ампіциліну, лінкоміцину, цефалексину, енрофлораксацину, неоміцину, пеніциліну.

Чутливість штамів *E. coli* до антибіотиків дещо інша: всі 7 ізолятів цього збудника є стійкими до амоксициліну, пеніциліну, тилозину, неоміцину, лінкоміцину, клоксациліну, рифампіцину, бацитрацину та цефалексину. 6 із 7 ізолятів стійкі до ампіциліну, а 5 із 7 – до стрептоміцину. Всі штами *E. coli* чутливі до гентаміцину та триметоприму, більшість (86%) – до амоксициліну + клавуланової кислоти та енрофлораксацину.

Чутливість до антибіотиків таких контагіозних агентів, як *Staph. aureus* та *S. agalactiae* є приблизно однаковою. Більшість ізолятів контагіозних збудників є чутливими до амоксициліну, амоксициліну + клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, клоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, цефалексину та триметоприму; стійкими до тилозину та стрептоміцину.

В результаті проведених нами досліджень наявність *Mycoplasma spp.* було виявлено у 63 зразках з усіх проб молока. Збудники *Mycoplasma bovis* були виявлені у 10 зразках молока. Спираючись на отримані результати, було запропоновано алгоритм відбору проб для проведення молекулярної діагностики маститу етіології *Mycoplasma*, а також послідовність доїння корів у несприятливих господарствах для запобігання поширенню захворювання.

З огляду на те, що деякі бактерії мають резистентність до засобів обробки дійок корів, існує потреба в регулярному тестуванні дезінфекційних засобів на ефективність.

Одержані результати нами чітко демонструють, що активність ферменту лактатдегідрогенази пов'язана зі збільшенням кількості СК в секреті молочної залози. Тести на активність ЛДГ дозволяють точніше визначити наявність запальних процесів у вимені, оскільки кількість СК також може зростати через

фізіологічні зміни (стрес тощо). Аналіз необхідний для виявлення груп ризику та покращення моніторингу якості молока, а також для контролю ефективності профілактичних заходів (вакцинація, лікування вимені спеціальними препаратами до та після доїння тощо).

Отримані нами дані протокової цитометрії свідчать, що соматичні клітини, які перебували у фазі некрозу у корів без маститу складали 24% проти 67% у корів з маститом. У корів без маститу соматичні клітини, які перебували у фазі апоптозу- 33% у порівнянні з 12% у корів з маститом. Можна зробити висновок, що апоптоз тісно пов'язаний з функціональністю нейтрофілів та макрофагів та відіграє ключову роль у захисті від вторгнення патогенів та фізіології запальної реакції. За результатами роботи було проведено удосконалення алгоритму діагностики субклінічних маститів.

Отже, розробка комплексної діагностики контагіозних маститів великої рогатої худоби є перспективним напрямом у біотехнології та профілактиці розповсюдження патогенних збудників, тому ми пропонуємо удосконалений алгоритм комплексної діагностики контагіозного маститу ВРХ.

У дисертаційній роботі, на підставі проведеного комплексу наукових досліджень удосконалено алгоритм діагностики контагіозного маститу корів, який полягає у комплексному застосуванні цих методів. Досліджені бактеріальні збудники, що дозволить оперативно оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження адекватної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність застосованих профілактичних засобів для попередження розповсюдження збудників на фермах.

ВИСНОВКИ

Таким чином, в ході дисертаційної роботи розроблений комплексний науковий біотехнологічний підхід до діагностики контагіозних маститів на фермах України, що полягає в належному відборі зразків молока хворих корів на субклінічний мастит та поетапному застосуванні комплексу діагностичних методів.

1. Визначено інфекційну етіологію маститу корів та встановлено, що основними збудниками запалення молочної залози є мікроорганізми, які представлені: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, що виділялись в різних асоціаціях, та *Mycoplasma spp.*
2. Проаналізовано чутливість та антибактеріальну резистентність збудників до антимікробних препаратів. Встановлено, що збудники контагіозного маститу є чутливими до амоксициліну, амоксициліну + клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, флоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, цефалексину та триметоприму; стійкими до тилозину та стрептоміцину.
3. Виявлено методом РТ-ПЛР генетичний матеріал *Mycoplasma bovis* на 10 фермах України з Миколаївської, Полтавської, Харківської, Київської області, що дає нам підставу зробити висновок про поширеність збудника на території України.
4. Проведено паралельне дослідження підрахунку кількості соматичних клітин та бактеріологічного культивування та визначено, що при низьких значеннях соматичних клітин в молоці (180 000 клітин в 1 мл. молока) можливо спостерігати субклінічне інфікування молочної залози корів.

5. Підтверджено, що при низьких значеннях соматичних клітин в молоці доцільно використовувати тест на лактатдегідрогеназу.
6. Впроваджено визначення ферменту лактатдегідрогенази у протоколи ТОВ «ЦВД», як допоміжного аналізу для визначення контагіозних субклінічних маститів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чубенко НВ., Малышева ЛА. Обеспечение качества и безопасности молока и молочной продукции. Ветеринарная патология.2012; 39(1):135-139.
2. Czyżak-Runowska G., Wójtowski J., Niewiadomska A., & Markiewicz-Keszycka M. Quality of fresh and stored mares' milk. Mljekarstvo/Dairy. 2018; 68(2):108-115. <http://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0204>
3. Brahim N. Review on mastitis and its economic effect. Canadian Journal of Scientific Research. 2017; 6(1): 13-22. DOI: 10.5829/idosi.cjsr.2017.13.22
4. Balaji Sri N., Saravanan R., Senthilkumar A., Srinivasan G. Effect of Subclinical Mastitis on Somatic Cell Count and Milk Profile Changes in Dairy Cows. Int. J. Sci. Environm. Technol. 2016; 5 (6): 4427–4431. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76118-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76118-6)
5. Down PM., Bradley AJ., Breen JE., Hudson CD., Green MJ. Current management practices and interventions prioritised as part of a nationwide mastitis control plan. The Veterinary Record, 2016; 178(18): 449.
6. Dego OK Aral F, Payan-Carreira R, Quaresma M. Control and Prevention of Mastitis: Part Two. Animal Reproduction in Veterinary Medicine. IntechOpen. 2020. doi:10.5772/intechopen.93484.
7. Правила ветеринарно-санітарної експертизи молока і молочних продуктів та вимоги щодо їх реалізації: Наказ Мінагрополітики від 20.04.2004 р. № 49/2004/ URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0579-04>.
8. Семчишин І. Поширення маститів. Аграрна наука та освіта в умовах Євроінтеграції [Internet]. Proceedings; 2018; 5: 84-85 thesis

9. Пастернак АМ. Морфологічні особливості молочної залози корів за лактаційних маститів. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. 2017; 34 (2): 194-197.
10. Белоглазов ПГ., Красный АВ. Современные методы диагностики мастита у коров. Молочная промышленность. 2009; 7: 83-84.
11. Явников НВ. Диагностика и лечение маститов коров. Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии. 2016; 1:71-77.
12. Павлов МЕ. Проблема диагностики, лечения и профилактики субклинических заболеваний у коров. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: материалы V Международной научно-производственной конференции. Белгород, 2001:51-52.
13. Любимов АИ., Бычкова ВА., Мануилова ЮГ. Влияние мастита на молочную продуктивность коров и пригодность молока для переработки. Вестник Казанского государственного аграрного университета. 2013; 8(2):130-134.
14. Rainard P., Riollet C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Veterinary research. 2006; 37(3): 369-400. DOI: 10.1051/vetres:2006007
15. Lawrence RM. Transmission of infectious diseases through breast milk and breastfeeding. Breastfeeding. 201: 406.
16. Zobel G., Leslie K., Weary DM., Von Keyserlingk MAG. Gradual cessation of milking reduces milk leakage and motivation to be milked in dairy cows at dry-off. Journal of Dairy Science. 2013; 96(8): 5064-5071.
17. Waller KP. Mammary gland immunology around parturition. Biology of the Mammary Gland. 2002: 231-245.
18. Boutinaud M., Jammes H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. Reproduction Nutrition Development. 2002; 42(2):133-147.

19. PetzerIM., KarzisJ., DonkinEF., WebbEC., & EtterE. Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2017;84(1):1-10. <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1269>
20. DangA. K., KapilaS., SinghC., & SehgalJ. P. Milk differential cell counts and compositional changes in cows during different physiological stages. *Milchwissenschaft*.2008;63(3):239-242.
21. Ezzat Alnakip M., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-NoI., Caamaño-Antelo S., Calo-MataP., & Barros-VelázquezJ.The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine*.2014; 2014.
22. Vishnoi PC., Dang AK., Kapila S. In vitro phagocytic activity of neutrophils in blood, normal and infected milk of Murrah buffaloes. *Buffalo J*. 2007; 1:51-59.
23. Swain DK, Kushwah MS, Kaur M, Dang AK. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. *Vet. World*. 2015; 8:336–345.
24. Swain DK, Kushwah MS, Kaur M, Patbandha TK, Mohanty AK, Dang AK. Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Vet. Res. Commun*. 2014; 38:209–219.
25. Alhussien MN, Dang AK. Integrated effect of seasons and lactation stages on the plasma inflammatory cytokines, function and receptor expression of milk neutrophils in Sahiwal (*Bos indicus*) cows. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2017; 191:14–21 <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.010>
26. Swain DK, Kushwah MS, Kaur M, Dang AK. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. *Vet. World*. 2015; 8:336–345. doi: 10.14202/vetworld.2015.336-345

27. Alhussien M, Manjari P, Sheikh AA, Seman SM, Reddi S, Mohanty AK, Dang AK. Immunological attributes of blood and milk neutrophils isolated from crossbred cows during different physiological conditions. *Czech J. Anim. Sci.* 2016; 61:223–231 <https://doi.org/10.17221/63/2015-CJAS>
28. Leitner G, Chaffer M, Krifucks O, Glickman A, Ezra E, Saran A. Milk leucocyte populations in heifers free of udder infection. *Zoonoses Public Health.* 2000; 47:133–138
29. Alhussien M, Kaur M, Manjari P, Kimothi SP, Mohanty AK, Dang A.K. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan fries' cows. *Vet. World.* 2015; 8:685–689. doi: 10.14202/vetworld.2015.685-689
30. MorrinST., McCarthyG., KennedyD., MarottaM., IrwinJA., & HickeyRM. Immunoglobulin G from bovine milk primes intestinal epithelial cells for increased colonization of bifidobacteria. *AMB Express*,2020;10(1):1-10.
31. Korhonen H., Marnila P., Gill H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition.*2000;84(1): 75-80.
32. Liu GL., Wang JQ., Bu DP., Cheng JB., Zhang CG., Wei HY.,DongXL. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The Veterinary Journal.* 2009; 182(1): 79-85.
33. Сафина НЮ., Юльметьева ЮР., Зиннатова ФФ., Шакиров ШК., Ахметов ТМ., & Гайнутдинова ЭР. Характеристика молочной продуктивности и качественного состава молока голштинского скота с разными генотипами гена лактоферрин (LTF). *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана.*2018;236(4):164-169.
34. Сафина, НЮ., Юльметьева, ЮР., Зиннатова, ФФ., Шакиров, ШК. Анализ полиморфизма гена лактоферрина (LTF) в популяциях голштинского скота.

Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2019;(2):88-94.
doi: 10.26155/vet.zoo.bio.201902014

35. Krol J., Litwinczuk Z., Brodziak A., & Barlowska J. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol J Vet Sci.* 2010;13(2): 357-61.

36. Carlsson Å., Björck L., Persson K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science.* 1989; 72(12): 3166-3175.

37. Freitas WR., da Silva Nascimento TC. E., Lins LF., de Lima Silva J., Moreira KA., Batista ÂMV., & Barbosa SBP. Lactoperoxidase enzyme activity and thiocyanate levels in raw milk of Girolando cows. *Medicina Veterinária (UFRPE).* 2020;14(4): 334-340.

38. Rowe S., Godden S., Nydam DV., Gorden P., Lago A., Vasquez A., Thomas M. Evaluation of rapid culture, a predictive algorithm, esterase somatic cell count and lactate dehydrogenase to detect intramammary infection in quarters of dairy cows at dry-off. *Preventive Veterinary Medicine.* 2020. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.104982

39. Blum SE., Heller DE., Jacoby S., Krifuks O., Merin U., Silanikove N., Leitner G. Physiological response of mammary glands to *Escherichia coli* infection: A conflict between glucose need for milk production and immune response. *Scientific Reports.* 2020;10(1):1-14.

40. Riekerink RGO., Barkema HW., Veenstra S., Poole DE., Dingwell RT., & Keefe GP. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal.* 2006;47(6):567.

41. Gussmann M., Steeneveld W., Kirkeby C., Hogeveen H., Nielen M., Farre M., & Halasa T. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for clinical contagious mastitis. *Journal of dairy science.* 2019;102(2):1483-1493.

42. Gussmann M., Steeneveld W., Kirkeby C., Hogeveen H., Farre M., & Halasa T. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. *Preventive veterinary medicine*.2019;166:78-85.
43. Souza FN., Blagitiz MG., Batista CF., Takano PV., Gargano RG., Diniz SA., De Vliegher S. Immune response in nonspecific mastitis: What can it tell us? *Journal of dairy science*.2020; 103(6): 5376-5386.
44. Salina A., Timenetsky J., Barbosa MS., Azevedo CM., Langoni H. Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.2020;40(2):82-87.
45. Abd El Tawab AA., El-hofy FI., Hassan NI., El-khayat ME. Prevalence of *Mycoplasma bovis* in bovine clinical mastitis milk in Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2019; 36(2): 57-65.
46. Junqueira NB., Salina A., Oliveira GC., Mettifogo E., Joaquim SF., Guimarães FF., Langoni, H. Detection of clinical bovine mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in Brazil. *Journal of Dairy Research*.2020: 1-3.doi: 10.1017/s0022029920000205
47. Oliveira TES., Pelaquim IF., Flores EF., Massi RP., Valdiviezo MJJ., Pretto-Giordano LG., Headley SA. *Mycoplasma bovis* and viral agents associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. *Transboundary and emerging diseases*.2020;67:82-93.
48. Gondaira S., Nishi K., Tanaka T., Yamamoto T., Nebu T., Watanabe R., Matsuda K. Immunosuppression in cows following intramammary infusion of *Mycoplasma bovis*. *Infection and Immunity*.2020;88(3) doi.org/10 .1128/IAI.00521-19
49. Dudek K., Nicholas RA., Szacawa E., Bednarek D. *Mycoplasma bovis* Infections—Occurrence, Diagnosis and Control. *Pathogens*.2020;9(8):640.
50. Liu Y., Xu S., Li M., Zhou M., HuoW., Gao J., HanB. Molecular characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* associated with mastitis on dairy farms in China. *Preventive Veterinary Medicine*.2020; 182:105106.

51. Hazelton MS., Morton JM., Parker AM., Bosward KL., Sheehy PA., Dwyer CJ., House JK. *Mycoplasma bovis* and other Mollicutes in replacement dairy heifers from *Mycoplasma bovis*-infected and uninfected herds: A 2-year longitudinal study. *Journal of Dairy Science*.2020;103(12):11844-11856.
52. Vähäniikkilä N., Pohjanvirta T., Haapala V., Simojoki H., Soveri T., Browning GF., Autio T.Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds. *Veterinary microbiology*. 2019; 231:107-115.
53. Anderson KL., Lyman R., Moury K., Ray D., Watson DW., Correa MT. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. *Journal of dairy science*. 2012;95(9):4921-4930.
54. Landin H., Mörk MJ., Larsson M., Waller KP. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2015;57(1):81.
55. Sears PM., McCarthy KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*.2003;19(1):171-85.
56. Le Maréchal C., Seyffert N., Jardin J., Hernandez D., Jan G., Raul L., Even S. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PloS one*.2011;6(11): e27354.
57. Wayne L. Hynes, Sheryl Lynne Walton, Hyaluronidases of Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 2000;183(2):201–207. doi.org/10.1111/j.1574-6968. 2000.tb08958.x
58. Sanz R., Marín I., Ruiz-Santa-Quiteria JA., Orden JA., Cid D., Diez RM., de la Fuente R. Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. anaerobius is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AJ000472 (*S. aureus* ATCC 12600 katA) and AJ000471 (*S. aureus* subsp. anaerobius MVF 213 katB). *Microbiology*.2000;146(2):465-475.

59. Dego OK., Van Dijk JE., Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly*.2002;24(4):181-198.
60. Middleton JR. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert review of vaccines*. 2008;7(6):805-815.
61. Грубер ИМ., Егорова НБ., Асташкина ЕА. Факторы патогенности *Staphylococcus aureus*-их роль в инфекционном процессе и в формировании поствакцинального иммунитета. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(3):88.
62. Быков АС., Воробьев АА., Пашков ЕП., Зверев ВВ., Караулов АВ., Быков СА., Корн МЯ. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – 2008.
63. Alluwaimi AM., Leutenegger CM., Farver TB., Rossitto PV., Smith WL., CullorJS. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*.2003;50(3):105-111.
64. Akineden Ö., Annemüller C., Hassan AA., Lämmle C., Wolter W., Zschöck M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001; 8(5):959-964.
65. Wang SC., Wu CM., Xia SC., Yong-HuaQI., Xia LN., Shen, JZ. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China.*Veterinary microbiology*.2009;137(3-4):276-281.
66. Бала СС. Биологические свойства микрофлоры, выделенной из молока коров с клинической и субклинической формами мастита. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*.2010;4:28-1.

67. Gogoi-Tiwari J, Williams V, Waryah CB, Costantino P, Al-Salami H, Mathavan S. Mammary Gland Pathology Subsequent to Acute Infection with Strong versus Weak Biofilm Forming *Staphylococcus aureus* Bovine Mastitis Isolates: A Pilot Study Using Non-Invasive Mouse Mastitis Model. PLoS ONE.2017;12(1): e0170668. doi.org/10.1371/journal.pone.0170668
68. Oliveira CSF., Hogeveen H., Botelho AM., Maia PV., Coelho SG., Haddad JPA. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. Preventive veterinary medicine.2015;121(3-4):297-305. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.001
69. Tong J., Zhang H., Zhang Y., Xiong B., Jiang L. Microbiome and Metabolomic Analysis of Milk from Dairy Cows with Subclinical *Streptococcus agalactiae* Mastitis Potential Biomarkers Frontiersin microbiology. 2019; 10: 2547. doi.org/10.3389/fmicb.2019.02547
70. Jørgensen CH., Østergaard S., Bennedsgaard TW., Kudahl AB Modeling the economic consequences of different management strategies against subclinical and clinical mastitis.29th NKV symposium. 2013.
71. Ali MM., Woldeamanuel Y., Asrat D., Fenta DA., Beall B., Schrag S., Mc GeeL. Features of *Streptococcus agalactiae* strains recovered from pregnant women and newborns attending different hospitals in Ethiopia. BMC Infectious Diseases. 2020;20(1):1-9.
72. Glaser P., Rusniok C., Buchrieser C., Chevalier F., Frangeul L., Msadek T., Trieu-Cuot P. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Molecular microbiology. 2002; 45(6): 1499-1513. doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002. 03126.x
73. Furfaro LL., Chang BJ., Payne MS. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. Clinical microbiology reviews.2018;31(4): e00049-18.

74. Raabe VN., Shane AL. Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). Gram-Positive Pathogens; 2019: 228-238.
75. Yao K., Poulsen K., Maione D., Rinaudo CD., Baldassarri L., Telford JL., DEVANI Study Group Capsular gene typing of *Streptococcus agalactiae* compared to serotyping by latex agglutination. Journal of clinical microbiology.2013;51(2):503-507.
76. Chen SL. Genomic insights into the distribution and evolution of group B streptococcus //Frontiers in Microbiology. – 2019. – T. 10.doi: 10.3389/fmicb.2019.01447.
77. Sheppard AE., Vaughan A., Jones N., Turner P., Turner C., Efstratiou A., Seale AC. Capsular typing method for *Streptococcus agalactiae* using whole-genome sequence data. Journal of clinical microbiology.2016;54(5): 1388-1390.doi: 10.1128/JCM.03142-15
78. Jin T., Brefo-Mensah E., Fan W., Zeng W., LiY., Zhang Y., Palmer M. Crystal structure of the *Streptococcus agalactiae* CAMP factor provides insights into its membrane-permeabilizing activity. Journal of Biological Chemistry. 2018;293(30):11867-11877.http://hdl.handle.net/10012/13341
79. Azevedo C., Pacheco D., Soares L., Romão R., Moitoso M., Maldonado J., Simões J Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). Tropical animal health and production. 2016; 48(2)451-459.doi10.1007/s11250-015-0973-6
80. Klaas IC., Zadoks RN. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. Transboundary and emerging diseases.2018; 65:166-185.
81. Pate IK., Godden SM., Royster E., Crooker BA., Timmerman J., Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk

- quality, and udder health in US dairy herds. *Journal of dairy science*.2019; 102(11): 10213-10234. doi.org/10.3168/jds.2019-16692
82. Wall SK., Hernández-Castellano LE., Ahmadpour A., Bruckmaier RM., Wellnitz O. Differential glucocorticoid-induced closure of the blood-milk barrier during lipopolysaccharide-and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows. *Journal of dairy science*.2016;99(9): 7544-7553.doi.org/10.3168/jds.2016-11093
83. Wang YM., Ma YQ., Bi SC., Ma XD., Guan R., Wang SH., Hu SH. Therapeutic effect of ginsenoside Rg1 on mastitis experimentally induced by lipopolysaccharide in lactating goats. *Journal of dairy science*.2019; 102(3): 2443-2452.doi.org/10.3168/jds.2018-15280
84. Taiaroa G., Harbison-PriceN., Ferguson SA., Carter GP., Williamson DA., Macknight RC., Heikal, A. Complete genome sequence of a New Zealand isolate of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *Genome announcements*.2018; 6 (9) doi: 10.1128/genomeA.00119-18.
85. Torky HA., Abu Tabeikh SM. Incidence of Coagulase Negative *Staphylococcus* Isolated from Mastitis Cows and Human Contact //Alexandria Journal for Veterinary Sciences. – 2016. – T. 51. – №. 2.
86. Sender G., Pawlik A., Korwin-Kossakowska A. Current concepts on the impact of coagulase-negative staphylococci causing bovine mastitis as a threat to human and animal health—a review. *Anim Sci Paper Rep*.2017; 35(2); 123-135.
87. Bochniarz M., Wawron W., Szczubiał M.: Coagulase-negative staphylococci (CNS) as an aetiological factor of mastitis in cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013, 16, 487-492.
88. Piepers S., SchukkenYH., Passchyn P., De Vliegher S. The effect of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in early lactating heifers on milk yield throughout first lactation revisited. *Journal of dairy science*.2013. 96(8); 5095-5105.doi.org/10.3168/jds.2013-6644

89. Taponen S., Liski E., Heikkilä AM., Pyörälä S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *Journal of dairy science*.2017;100 (1): 493-503.doi.org/10.3168/jds.2016-11465
90. Stobnicka-Kupiec A., Gołofit-Szymczak M., Górny R. Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2019; 26(4):555-565.
91. Gonçalves JL., Tomazi T., Barreiro JR., Beuron DC., Arcari MA., Lee SH. I., Santos MV. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. *The Veterinary Journal*.2016; 209: 87-92.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.009
92. Цибулевский АЮ., Соколов АВ. Микроэкология человека (Часть II). *Успехи современного естествознания*.2008;7; 22-26.
93. Гольцева ЕВ. Механизмы возникновения и пути преодоления резистентности у различных лекарственных препаратов. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*.2013; 6:007-009.
94. Мостовой ЮМ., Демчук АВ. Пенициллины и цефалоспорины как лидеры в потреблении антибиотиков. 2012.
95. Покудина ИО., Шкурат МА., Батталов ДВ. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам. *Живые и биокосные системы*. 2014; 10: 10-10.
96. Абдалкин МЕ. Сравнительное изучение лекарственной резистентности золотистого стафилококка, ассоциированного с воспалительными заболеваниями органов дыхания. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2011; 41.

97. Абдалкин МЕ. Исследование действия новых комбинированных антимикробных рецептур на микроорганизмы in vitro //Современные проблемы науки и образования. 2011;4:2-2.
98. Недашківська ВВ., Дронова МЛ., Вринчану НО. Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях //Український науково-медичний молодіжний журнал. 2016;4:10-19.
99. Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host //Scientific reports. 2018;8(1):1-7.
100. Watters C., Fleming D., Bishop D., Rumbaugh KP Host responses to biofilm. Progress in molecular biology and translational science.Academic Press.2016;142:193-239. doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.007
101. Melchior MB., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections.The Veterinary Journal.2006;171(3):398-407.
102. Vasudevan P., Nair MKM., Annamalai T.,Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation.Veterinary microbiology.2003;92(1-2):179-185.
103. Oliveira M., Bexiga R., Nunes SF., Carneiro C., Cavaco LM., Bernardo F.,Vilela, CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.Veterinary Microbiology.2006;118(1-2):133-140
104. Marques VF., Motta CCD., Soares BDS., Melo DAD., Coelho SDMDO., Coelho, IDS.,Souza MMSD. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis.Brazilian journal of microbiology.2017;48(1):118-124.

105. Wu X., Wang Y., Tao L. Sulphydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. FEMS microbiology letters.2011;316(1):44-50.
106. Anderson MJ., Schaaf E., Breshears LM., Wallis. HW., Johnson JR., Tkaczyk C., Peterson. Alpha-toxin contributes to biofilm formation among *Staphylococcus aureus* wound isolates.Toxins. 2018; 10(4):157.
107. Tormo MA., Knecht E., Götz F., Lasa I., Penades JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. Microbiology.2005;151(7): 2465-2475
108. Liu M., Wu X., Li J., Liu L., Zhang R., Shao D., Du X. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the ica operon.Food Control.2017;73:613-618.
109. Dufour SA, Fréchette HW. Barkema A. Mussell DT. Scholl. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. J. Dairy Sci. 2011; 94:563–579.
110. Lukas JM., Hawkins DM, Kinsel ML., Reneau J.K. Bulk tank somatic cell counts analyzed by statistical process control tools to identify and monitor subclinical mastitis incidence. J. Dairy Sci. 2005; 88:3944–3952.
111. Ruegg PL. New Perspectives in Udder Health Management. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2012; 28:149–163.
112. Котелевич ВА., Згозінська ОА. Ветеринарно-санітарна оцінка молока, отриманого від корів у дослідному господарстві Городецьке, Володимирецького району, Рівненської області. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК 2, 2014; 3:106-110.
113. Blowey R., Edmondson P.Mastitis control in dairy herds. [electronic resource]. Wallingford: CABI, 2010.

114. Keefe G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2012; 28:203– 216.
115. Hogan J., Gonzales RN., Harmon R, Nickerson S.C., Pankey J., Smith K.. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Rev. ed. National Mastitis Council Inc, Madison, WI. 2012.
116. Nyman AK., Waller KP., Emanuelson U., Frössling J. Sensitivity and specificity of PCR analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary infections in dairy cows using latent class analysis. Preventive veterinary medicine.2016;135:123-131.
117. Koskinen MT., Holopainen J., Pyörälä S., Bredbacka P., Pitkälä A., Barkema HW., Bexiga R, Roberson J., Sølverød L., Piccinini R., Kelton D, Lehmusto H., Niskala S., Salmikivi L. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. J. Dairy Sci.2009; 92:952–959.
118. Koskinen MT., Wellenberg G.J., Sampimon OC., Holopainen J., Rothkamp A., Salmikivi L., Haeringen WA., Lam TJGM, S. Pyörälä. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. J. Dairy Sci.2010; 93:5707–5715.
119. Viguier CS. Arora N. Gilmartin K. Welbeck, Kenned RO. Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol. 2009; 27:486–493.
120. Farre M. Practical application of on farm culturing //Mastitis conference. – 2016:47.
121. Alekish MO., Ismail ZB., Hammouri HM., Daradka MH., Taha Al, Olymatl S. Bacteriological cure rate and changes in milk composition in mastitis vaccinated ewes affected with subclinical mastitis. Veterinary world.2018.;11(2):125.

122. Kano R., Sato A., Sobukawa H., Sato Y., Ito T., Suzuki K., Kamata H. ELISA system for screening of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*. Journal of dairy science.2016;99(8):6590-6593.
123. Nicholas RAJ., Fox LK., Lysnyansky I. *Mycoplasma* mastitis in cattle: To cull or not to cull. The Veterinary Journal.2016; 216:142-147.
124. Reyes J., Sanchez J., Stryhn H., Ortiz T., Olivera M., Keefe G. P. Influence of milking method disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. The Veterinary Journal, 2017, 220: 34-39
125. Фотіна ТІ., Зажарська НМ, Костюченко ВЮ. "Вплив засобів для доїння на санітарну якість козиного молока." Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицини. 2015;7: 59-62.
126. Скляр ОІ. "Роль ветеринарно-санітарних заходів та правил доїння корів у профілактиці субклінічного маститу." Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького. 2010;12.3-4
127. Zdanowicz M., Shelford JA., Tucker CB., Weary DM., Von Keyserlingk MA. G. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. Journal of dairy science, 2004, 87.6: 1694-1701.
128. Schukken Y., Chuff M., Moroni P., Gurjar A., Santisteban C., Welcome F., Zadoks R. The “other” gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. Veterinary Clinics: Food Animal Practice.2012; 28.2: 239-256.
129. Munoz MA., Ahlström C., Rauch BJ., Zadoks RN. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. Journal of dairy science. 2006; 89.9: 3425-3430.

130. Gleeson, David, Jimmy Flynn, and Bernadette O'Brien. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. *Irish veterinary journal*. 2018;71.1: 11.
131. Quirk T., Fox L. K., Hancock D. D., Capper J., Wenz J., Park J. Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative staphylococci after postmilking teat disinfection: Species-specific responses. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95.4: 1906-1912.
132. Lam TJGM., Van Vliet, J. H., Schukken, Y. H., Grommers, F. J., van Velden-Russcher A., Barkema HW., Brand A. The effect of discontinuation of postmilking teat disinfection in low somatic cell count herds. I. Incidence of clinical mastitis. *Veterinary Quarterly*, 1997; 19.2: 41-47.
133. Nickerson, Stephen C. Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. Louisiana State University Agricultural Center. Homer, Louisiana, 2001.
134. Leslie KL., Kelton DF., Wagter LC., Day KJ., Storey DL., Melicherick J., Godkin MA. Milking management and bulk milk iodine concentrations in Ontario dairy herds. In: *American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference*. 1999:190-192.
135. Klostermann K., Crispie F., Flynn J., Meaney W., Ross RP., Hill C. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of dairy research*, 2010;77(2): 231-238.
136. Oliver SP., King SH., Lewis MJ., Torre PM., Matthews KR., Dowlen HH. Efficacy of chlorhexidine as a postmilking teat disinfectant for the prevention of bovine mastitis during lactation. *Journal of dairy science*, 1990, 73.8: 2230-2235.
137. Morrill KM., Smith JS., Dann HM., Gauthier HM., Ballard CS. Evaluation of powdered 0.5% chlorhexidine acetate-based postmilking teat dip compared with a

foamed 1% iodine-based postmilking teat dip under cold weather conditions in northern New York. *Journal of dairy science*. 2019;102(3):2507-2514.

138. Loosemore, Michael J. Dairy animal teat disinfectant. U.S. Patent No 9,913,859, 2018.

139. Breen J. The importance of teat disinfection in mastitis control. *Livestock*, 2019, 24.3: 122-128.

140. YanuartonoY., NururroziA., IndarjuliantoS., PurnamaningsihH., RamandaniD. The Benefits of Teat Dipping as Prevention of Mastitis. *Journal of Livestock Science andProduction*.2020;4.1: 231-249.

141. Li N., Richoux R., Boutinaud M., Martin P., Gagnaire V. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy science & technology*. 2014; 94(6): 517-538.

142. Sinha MK., Thombare NN., Mondal B. Subclinical mastitis in dairy animals: incidence, economics, and predisposing factors. *The Scientific World Journal*, 2014.

143. Barillet F., Rupp R., Mignon-Grasteau S., Astruc JM., Jacquin M. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genetics Selection Evolution*, 2001;33(4):1-19.

144. Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary research*. 2003;34(5):475-491.

145. Hadrich JC., Wolf CA., Lombard J., Dolak TM. Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. *Journal of dairy science*.2018;101(4):3588-3596.

146. Коренник ИВ. Соматические клетки в молоке. *Ветеринария*. 2010;(6):10-13.

147. Русько НП. Мониторинг уровня соматических клеток в молоке как инструмент, улучшающий его качество. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво. 2015; 2: 173-175.
148. Bradley A., Green M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice*. 2005; 27(6):310-315.
149. Akers RM. Lactation and the mammary gland. John Wiley & Sons. 2016
книга
150. Idriss SE., Foltys V., Tančin V., Kirchnerová K., Zaujec K. Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science*. 2013; 46(3):115-119.
151. Kehrli Jr ME., Harp JA. Immunity in the mammary gland. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. 2001;17(3):495-516. DOI: [10.1016/s0749-0720\(15\)30003-7](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30003-7)
152. Lynch EM., Earley B., McGee M., Doyle S. Characterisation of physiological and immunological responses in beef cows to abrupt weaning and subsequent housing. *BMC Veterinary Research*. 2010; 6(1):1-8.
153. Sordillo LM. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 2018; 34(3):507-523.
154. Huang YQ., Morimoto K., Hosoda K., Yoshimura Y., Isobe N. Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012;145(1-2): 499-504.
155. Viguier C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K., O’Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology*. 2009; 27(8):486-493

156. Gulbe G., Pilmane M., Saulīte V., Doniņa S., Jermolajevs J., Peškova L., Valdovska, A. Cells and Cytokines in Milk of Subclinically Infected Bovine Mammary Glands after the Use of Immunomodulatory Composition GLP 810. Mediators of inflammation, 2020.
157. Côté-Gravel, Julie, and François Malouin. "Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies." *Journal of dairy science* 102.5. 2019: 4727-4740. DOI: [10.3168/jds.2018-15272](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272)
158. НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ ДСТУ 3662:2018 МОЛОКО-СИРОВИНАКОРОВ'ЯЧЕ http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=77350
159. Антощенко ВВ., Копитко ОВ. Державне регулювання і підтримка молочної галузі в умовах євроінтеграції. 2018.
160. Besier J., Lind O., Bruckmaier RM. Dynamics of teat-end vacuum during machine milking: types, causes and impacts on teat condition and udder health—a literature review. *Journal of Applied Animal Research*. 2016;44(1):263-272.
161. MazurenkoVR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2017;3(3):26–29.
162. MazurenkoVR., Manchulyak OV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. *Biotechnologia Acta*. 2017;10(4):53-54.
163. Mazurenko VR, Dreval DV, Sobko IO. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. *Bacterial empire. Scicell*. 2020;3(4):77-80.
164. Alhussien MN., Dang AK. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview.

Veterinary world. 2018; 11(5): 562–577. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>

165. Boutet P., Boulanger D., Gillet L., Vanderplasschen A., Closset R., Bureau F., Lekeux P. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *Journal of dairy science*. 2004; 87(12): 4104-4114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73553-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73553-5).

166. Koess C., Hamann, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*. 2008; 75(2): 225-232. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003245P>

167. Mehrzad J., Duchateau L., Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *Journal of dairy science*. 2004; 87(12), [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73558-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73558-4)

168. Malik TA., Mohini M., Mir SH., Ganaie BA., Singh D., Varun TK., Thakur S. Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review. *J Anim Health Prod*. 2018; 6(1): 18-26. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2018/6.1.18.26>

169. Mehrzad J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*. 2002; 85(12); 3268-3276. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74415-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74415-9)

170. Motyl T., Gajewska M., Zarzynska J., Sobolewska A., Gajkowska B. Regulation of autophagy in bovine mammary epithelial cells. *Autophagy*. 2007; 3(5): 484-486. doi.org/10.4161/auto.4491

171. Piepers S., De Vliegher S., Demeyere K., Lambrecht B.N., de Kruif A., Meyer E., Opsomer G. Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. *Journal of dairy science*. 2009; 92(2): 626-631. doi.org/10.3168/jds.2008-1393

172. Van Oostveldt K., Paape M.J., Dosogne H., Burvenich C. Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. Domestic Animal Endocrinology. 2002; 22(1): 37-50. doi.org/10.1016/S0739- 7240(01)00115-1
173. Harada K., Irie S., Ohnishi M., Kataoka Y. Assessment of the Usefulness of Cefapirin and Cefalonium Disks for Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. Antibiotics. 2020; 9(4): 197.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ*Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації*

1. MazurenkoVR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017;3(3):26–29.
2. MazurenkoVR., ManchulyakOV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. Biotechnologia Acta. 2017;10(4):53-54.
3. Mazurenko VR, Dreval DV, Sobko IO. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. Bacterial empire. Scicell. 2020;3(4):77-80. (Республіка Словачія)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Мазуренко ВР (Хайруліна), Нечипоренко ОО. Перспективи використання штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* ІКМ В-5113 для профілактики маститів корів. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології; 2014 лютий 23-24; Донецьк, Україна. 2014, С. 286. (усна доповідь)
2. Мазуренко ВР (Хайруліна). Оцінка вмісту лізоциму в секреті вимені корів хворих на субклінічний мастит. Імунологія та алергологія додаток №1 Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в ХХІ столітті; 2014 квітня 10-11; Київ, Україна. 2014. С 166. (стендова доповідь)
3. MazurenkoVR., MazurenkoOV, ChvostenkoOG. Bactericidal effect of post-milking teat dip by «Povidon-Protect». II International Scientific Conference, Microbiology

and Immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine. 2016. P. 119; (стендова доповідь)

4. Mazurenko VR, Sobko IO. Evaluate effectiveness of different antibiotics and prevalence of contagious mastitis pathogens on dairy farms in Ukraine. II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine. 2016. P. 114; (усна доповідь).
5. Mazurenko VR, Sobko IO, Molozhava OS, Kolybo DV. Milk analysis by flow cytometry to identify subclinical mastitis. Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна 2020. с. 11-14. (публікація тез).

ДОДАТОК 2

Діюча речовина антибіотика	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus spp (CNS)</i>		<i>Streptococcus spp.</i>		<i>Streptococcus paratyberis</i>		<i>Streptococcus bovis</i>		<i>Streptococcus uberis</i>		<i>Pasteurella spp.</i>	
	№	%	№	%	№	%	№	%	№	%	№	%	№	%	№	%	№	%
Амоксицилін	10	100	17	100	0	0	7	78	6	75	4	100	1	100	2	100	3	75
Амоксицилін + Клавуланова кислота	10	100	17	100	6	86	8	89	7	87.5	3	75	1	100	2	100	4	100
Гентаміцин	10	100	16	94	7	100	9	100	7	87.5	3	75	1	100	1	50	4	100
Енрофлоксацин	8	80	7	41	6	86	9	100	4	50	0	0	0	0	0	0	4	100
Флорфенікол	9	90	11	65	4	57	8	89	4	50	3	75	0	0	0	0	3	75
Стрептоміцин	5	50	9	53	2	29	8	89	3	37.5	0	0	0	0	0	0	3	75

ДОДАТОК 2 (продовження таблиці)

Діюча речовина антибіотика	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus spp (CNS)</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus paratyphus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Pasteurella spp.</i>									
	№	%	№	%	№	%	№	%	№									
Триметоприм	10	100	13	76	7	100	8	89	3	37.5	2	50	0	0	0	3	75	
Ампицилін	9	90	15	88	1	14	5	55.5	5	62.5	3	75	1	100	0	3	75	
Пеніцилін	8	80	12	76.5	0	0	4	44	4	50	3	75	0	0	0	3	75	
Тетрациклін	3	30	3	29	0	0	1	11	1	12	0	0	0	0	0	3	75	
Неомицин	9	90	10	89	0	0	9	100	3	37.5	0	0	0	0	0	4	100	
Линкозамід	9	90	16	94	0	0	8	89	2	25	2	50	0	0	0	4	100	
Клоксацилін	9	90	17	100	0	0	9	100	4	59	3	75	1	100	2	100	3	75
Рифампіцин	10	100	17	100	0	0	9	100	6	75	4	100	0	0	2	100	4	100
Ванілілін	9	90	17	100	0	0	8	89	6	75	3	75	1	100	2	100	3	75
Цифлаксим	10	100	14	82	0	0	7	78	3	37.5	2	50	1	100	1	50	3	75
Всього флавінів	10	17			7		9		8	4		1	2			4		